

QUÍMICA FARMACÉUTICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

**DISEÑO, SÍNTESIS Y BIOEVALUACIÓN ANTIDIABÉTICA *IN*
COMBO DE BENCILIDEN-1,3-TIAZOLIDIN-2,4-DIONAS Y
DERIVADOS DEL ÁCIDO FENILPROPANOICO**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DRA. EN FARMACIA

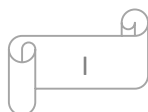
PRESENTA:

M.F BLANCA IRIS COLÍN LOZANO

DIRECTOR DE TESIS:

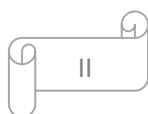
DR. GABRIEL NAVARRETE VÁZQUEZ

Cuernavaca Morelos 2018



ÍNDICE

RESUMEN	IV
ABSTRACT	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Diabetes	3
2.1.1 Diabetes tipo 2	3
2.2 Epidemiología	3
2.3 Signos y síntomas	4
2.4 Diagnóstico	5
2.4.1 Prediabetes	5
2.4.2 Criterios de diagnóstico.....	5
2.5 Fisiopatología de la DM2.....	6
2.5.1 Señalización de la insulina.....	6
2.5.1 Mecanismos de señalización implicados en la resistencia a la insulina.....	6
2.6 Complicaciones de la DM2	8
2.6.1 Complicaciones macrovasculares.....	8
2.6.2 Complicaciones microvasculares.....	9
2.7 Tratamiento farmacológico DM2.....	9
2.7.1 Inhibidores de la gluconeogénesis hepática (biguanidas)	9
2.7.2 Sulfonilureas.....	9
2.7.3 Meglitinidas o glinidas.....	10
2.7.4 Inhibidores de alfa-glucosidasas	10
2.7.5 Agonistas de GLP-1.....	11
2.7.6 Inhibidores de DPP4	12
2.7.7 Inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2).....	12
2.8 Tiazolidindionas o glitazonas	13
2.8.1 Receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR)	13
2.8.2 ligandos endógenos PPAR- γ	14
2.8.2 Mecanismo molecular.....	15
2.8.2 Ligandos sintéticos PPAR- γ	16
2.9 GPR40 (FFA1)	18
2.9.1 Mecanismo molecular GPR40	19

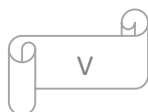


2.9.2 Ligandos endógenos y sintéticos de GPR40	21
2.10 Proteínas fosfatasa de tirosina 1B (PTP1B)	22
2.10.1 Mecanismo molecular de PTP1B	23
2.10.2 Mecanismo catalítico PTP1B	23
2.10.3 Inhibidores de PTP1B	25
2.11 Aldosa reductasa (AR)	26
2.11.1 Mecanismo catalítico AR	26
2.11.2 Mecanismo molecular AR	27
2.11.3 Inhibidores AR	28
3. JUSTIFICACIÓN	30
4. HIPÓTESIS	30
4.1 Objetivo general	30
4.2 Objetivos específicos	30
5. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO MOLECULAR	32
5.1 FARMACÓFOROS	36
5.1.2 Farmacóforo de la serie A	36
5.1.3 Farmacóforo de la serie B	37
6. RETROSÍNTESIS	38
6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	41
6.1 Parte química	42
6.2 Parte in silico	43
6.2.1 Predicción de la actividad biológica: PASS	43
6.2.2 ACD/Tox Suite	43
6.2.3 admet-SAR	44
6.2.4 DIA-DB	44
6.2.5 Acoplamiento molecular refinado	45
6.3 Parte farmacológica	46
6.3.1 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto sobre receptores PPAR α/γ y transportador de glucosa tipo 4 (GLUT-4) y FATP-1	46
6.3.2 Ensayo antidiabético (Modelo murino de diabetes mellitus no insulino dependiente) ...	47
6.3.3 Ensayos de inhibición sobre PTP1B	48
6.3.4 Aldosa reductasa	49
6.3.5 Ensayo <i>in vitro</i> sobre GPR40	49



7. RESULTADOS	51
7.1 PARTE QUÍMICA	51
7.1.1 Síntesis de benciliden-1,3-tiazolidin-2,4-dionas ACB-1-6 (serie A)	51
7.1.2 Metodología general de síntesis de los derivados del ácido fenilpropanoico ACB-7-10 (serie B).	53
7.1.3 Síntesis de los compuestos finales ACB-7-10	57
7.1.4 Caracterización estructural	59
7.2 PARTE IN SILICO	74
7.2.1 PASS.....	74
7.2.2 Evaluación <i>in silico</i> de los compuestos sintetizados, en el programa computacional ACD/Tox Suite	75
7.2.3 admetSAR.....	81
7.2.4 DIA-DB	82
7.3 PARTE IN VITRO	84
7.3.1 Prueba de funcionalidad celular MTT	84
7.3.2 Ensayo <i>in vitro</i> sobre la expresión relativa de PPAR- γ y GLUT4.....	86
7.3.3 Inhibición de la enzima aldosa reductasa	90
7.3.4 Ensayo de inhibición de la enzima proteína fosfatasa de tirosina 1B (PTP1B)	95
7.3.5 Evaluación <i>in vitro</i> sobre GPR40	100
7.4 PARTE IN VIVO	104
7.4.1 Evaluación <i>in vivo</i> del efecto antidiabético del compuesto ACB-6 utilizando un modelo murino de diabetes no insulino-dependiente.....	105
7.4.2 Evaluación <i>in vivo</i> del efecto antidiabético del compuesto ACB-7 utilizando un modelo murino de diabetes no insulino-dependiente.....	107
7.4.3 Evaluación <i>in vivo</i> del efecto antidiabético del compuesto ACB-1 utilizando un modelo murino de diabetes no insulino-dependiente.....	107
7.4.4 Evaluación <i>in vivo</i> del efecto antidiabético del compuesto ACB-9 utilizando un modelo murino de diabetes no insulino-dependiente.....	108
7.4.5 Evaluación <i>in vivo</i> del efecto antidiabético del compuesto ACB-4 utilizando un modelo murino de diabetes no insulino-dependiente.....	109
7.4.6 Evaluación <i>in vivo</i> del efecto antidiabético del compuesto ACB-8 utilizando un modelo murino de diabetes no insulino-dependiente.....	111
7.5 PARTE IN SILICO A POSTERIORI	112
7.5.1 Acoplamiento molecular sobre la enzima aldosa reductasa.	112
7.5.2 Acoplamiento molecular sobre PPAR- γ	118

7.5.3 Acoplamiento molecular sobre la enzima PTP1B.....	124
7.5.4 Acoplamiento molecular sobre GPR40	129
8. CONCLUSIONES.....	137
9. PERSPECTIVAS.....	138
10. BIBLIOGRAFÍA	139
11. PARTE EXPERIMENTAL.....	144
10.1 Instrumentación	144
10.2 Cromatografía.....	144
10.3 Síntesis de los compuestos finales ACB-1-10.....	146
10.3.1 Síntesis de (5Z)-5-[4-(bifenil-3-ilmetoxi)benciliden]-1,3-tiazolidin-2,4-diona (ACB-1)	146
10.3.2 Síntesis de (5Z)-5-[4-(1-naftilmetoxi)benciliden]-1,3-tiazolidin-2,4-diona (ACB-2)	147
10.3.3 Síntesis de (5Z)-5-[4-(quinolin-2-ilmetoxi)benciliden]-1,3-tiazolidin-2,4-diona (ACB-3)	148
10.3.4 Síntesis de (5Z)-5-[4-(piridin-2-ilmetoxi)benciliden]-1,3-tiazolidin-2,4-diona (ACB-4)	149
10.3.5 Síntesis de 5Z)-5-[4-[(4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metoxi]benciiden]-1,3-tiazolidin-2,4-diona (ACB-5)	150
10.3.6 Síntesis de (5Z)-5-(4-{[3-metil-4-(2,2,2-trifluoroetoxi)piridin-2-il]metoxi}benciliden)-1,3-tiazolidin-2,4-diona (ACB-6)	151
10.3.7 Síntesis de ácido 3-[4-(bifenil-3-ilmetoxi)fenil]propanoico (ACB-7)	152
10.3.8 Síntesis de ácido 3-[4-(1-naftilmetoxi)fenil]propanoico (ACB-8)	153
10.3.8 Síntesis de ácido 3-[4-[(2'-cianobifenil-4-il)metoxi]fenil]propanoico (ACB-9)	154
10.3.10 Síntesis de ácido 3-[4-(quinolin-2-ilmetoxi)fenil]propanoico (ACB-10)	155
10.4 Síntesis de precursores 11-21	156
10.4.1 Síntesis de 4-(bifenil-3-ilmetoxi)benzaldehído (11)	156
10.4.2 Síntesis de 4-(1-naftilmetoxi)benzaldehído (12)	157
10.4.3 Síntesis de 4-(quinolin-2-ilmetoxi)benzaldehído (13)	158
10.4.4 Síntesis de 4-(piridin-2-ilmetoxi)benzaldehído (14)	159
10.4.5 Síntesis de 4-[(4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metoxi]benzaldehído (15)	160
10.4.6 Síntesis de 4-[[3-metil-4-(2,2,2-trifluoroetoxi)piridin-2-il]methoxi]benzaldehído (16)	161
10.4.7 Síntesis de 3-(4-hidroxifenil)propanoato de etilo (17)	162
10.4.8 Síntesis de 3-[4-(bifenil-3-ilmetoxi)fenil]propanoato de etilo (18)	163
10.4.9 Síntesis de 3-[4-(1-naftilmetoxi)fenil]propanoato de etilo (19)	164
10.4.10 Síntesis de 3-[4-[(2'-cianobifenil-4-il)metoxi]fenil]propanoato de etilo (20)	165
10.4.11 Síntesis de 3-[4-(quinolin-2-ilmetoxi)fenil]propanoato de etilo (21)	166



12. ESPECTROS..... 167

Figura 1. Número de personas con diabetes en todo el mundo y por región en 2017 y 2045 (20-79 años).^{3 4}

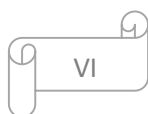


Figura 2. Tejido adiposo sano e hipertrofiado. Modificado de ²⁸	7
Figura 3. Principales complicaciones de la DM. Modificado de ³	8
Figura 4. Biguanidas	9
Figura 5. Sulfonilureas de primera, segunda y tercera generación.	10
Figura 6. Meglitinidas	10
Figura 7. Inhibidores de la enzima alfa-glucosidasa	11
Figura 8. Secuencia de los agonistas de GLP-1. Con una flecha se indica el lugar en donde la DPP4 corta la cadena peptídica.	12
Figura 9. Inhibidores de DPP4	12
Figura 10. Inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2)	13
Figura 11. Agonistas PPAR- γ	13
Figura 12. Ligandos endógenos PPAR- γ	14
Figura 13. Ligandos sintéticos PPAR- γ	16
Figura 14. Convergencia de rutas PPAR- γ , GPR40, PTP1B y AR. Modificado de ⁶⁵	18
Figura 15. Expresión y efectos de GPR-40 en diferentes órganos. Modificado de ^{14, 66, 67}	19
Figura 16. Mecanismo molecular de liberación de insulina vía GPR40 por agonistas totales y parciales. ⁶⁸	20
Figura 17. Relación entre DM2 y EA. Modificado de ⁷¹	21
Figura 18. Agonistas GPR40	22
Figura 19. Mecanismo de señalización de PTP1B y leptina. ⁷⁵	23
Figura 20. Mecanismo catalítico de la enzima PTP1B	24
Figura 21. Inhibidores de PTP1B	25
Figura 22. Mecanismo catalítico de la reducción de carbonilos a alcoholes por AR	26
Figura 23. Vía de señalización de aldosa reductasa	28
Figura 24. Inhibidores de la enzima aldosa reductasa	29
Figura 25. Alineamiento molecular de las moléculas DHA (morado), TUG-891 y ACB-7 (cian).	32
Figura 26. Farmacóforo de agonistas duales y GPR40.	32
Figura 27. Requerimientos farmacofóricos de los inhibidores de aldosa reductasa.	33
Figura 28. Fármacos de referencia para el diseño de los compuestos ACB-1-10.	35
Figura 29. Diseño y modificaciones estructurales de los compuestos ACB-1-10.	36
Figura 30. Farmacóforo de SHF-1 (A) Y ACB-1 (B).	36
Figura 31. Alineamiento molecular del farmacóforo de SHF-1 (verde) con el del compuesto diseñado ACB-1 (morado).	37
Figura 32. Farmacóforos de TUG-891 (A), SHF-1 (B) y ACB-7 (C).	37
Figura 33. Alineamiento molecular de las moléculas SHF-1 (azul), TUG-891 (rosa) y ACB-7 (morado).	38
Figura 34. Espectro de RMN 1H del compuesto ACB-7.	59
Figura 35. Expansión de la zona aromática del espectro de RMN 1H del compuesto ACB-7	60
Figura 36. Espectro de RMN 13C del compuesto ACB-7.	61
Figura 37. Expansión de la zona aromática del espectro de RMN ¹³ C del compuesto ACB-7.	62
Figura 38. Cromatograma del compuesto ACB-7.	62
Figura 39. Espectro de masas IE del compuesto ACB-7.	63
Figura 40. Gráficas de porcentaje de funcionalidad celular de los compuestos ACB-1, ACB-4, ACB-7 y ACB-9 a diferentes concentraciones: 1, 10, 100 y 1000 μ M. Los resultados corresponden a la media \pm EEM, n=2.	85
Figura 41. Fármacos inhibidores de aldosa reductasa.	91
Figura 42. Comparación estructural de L-idosa y 4-hidroxi-nonenal (HNE) en su forma abierta y cíclica.	95
Figura 43. SAR vs la enzima PTP1B	100

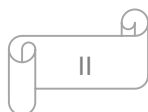


Figura 44. SAR vs GPR40	104
Figura 45. Comparación del compuesto ACB-6 con MGJ-8 y Lansoprazol y el fragmento común.	106
Figura 46. Comparación estructural de Pioglitazona (agonista total) y el compuesto ACB-4.	110
Figura 47. Sitio de unión de inhibidores de AR. ⁸³	113
Figura 48. Visualización en tercera dimensión del compuesto ACB-6 (morado) en la cavidad del sitio activo de aldosa reductasa (cian); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en color rosa (Trp 20 y Val 47).	114
Figura 49. Visualización en segunda dimensión del compuesto ACB-6 en el sitio activo de aldosa reductasa; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).	115
Figura 50. Sobreposición del compuesto ACB-6 (magenta) con IDD 740 (verde) en la cavidad de aldosa reductasa.	115
Figura 51. Visualización en tercera dimensión del compuesto ACB-7 (verde) en la cavidad del sitio activo de aldosa reductasa (gris); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en color rosa (Trp 20 y Trp 111).	116
Figura 52. Visualización en segunda dimensión del compuesto ACB-7 en el sitio activo de aldosa reductasa; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).	117
Figura 53. Sobreposición del compuesto ACB-7 (cian) con IDD 740 (azul marino) en la cavidad de aldosa reductasa.	117
Figura 54. Visualización en tercera dimensión de Tesaglitazar (azul) en la cavidad del sitio activo de PPAR- γ (rosa); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (His 449, His 323, Ser 289).	118
Figura 55. Visualización en segunda dimensión de Tesaglitazar en el sitio activo de PPAR- γ ; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).	119
Figura 56. Visualización en tercera dimensión del compuesto ACB-1 (morado) en la cavidad del sitio activo de PPAR- γ (blanco); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (Arg 280, Cys 285).	120
<i>Figura 57. Modo de unión de ACB-1 en el sitio activo de PPAR-γ(superficie en blanco) los aminoácidos mostrados son los que participan en las interacciones polares.</i>	121
Figura 58. Visualización en dos dimensiones del compuesto ACB-1 en el sitio activo de PPAR- γ ; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).	121
Figura 59. Visualización en tercera dimensión del compuesto ACB-4 (magenta) en la cavidad del sitio activo de PPAR- γ blanco); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (His 323, Ser 289).	122
Figura 60. Modo de unión de ACB-4 en el sitio activo de PPAR- γ (superficie en blanco) los aminoácidos mostrados son los que participan en las interacciones polares.	122
Figura 61. Visualización en segunda dimensión del compuesto ACB-4 en el sitio activo de PPAR- γ ; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).	123
Figura 62. Visualización en tercera dimensión del compuesto ACB-9 (azul) en la cavidad del sitio activo de PPAR- γ (blanco); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en rojo (His 323, Ser 289, Tyr 473, Ser 342).	124
Figura 63. Visualización en segunda dimensión del compuesto ACB-9 en el sitio activo de PPAR- γ ; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul) y π - π (línea en amarillo).	124
Figura 64. Visualización en tercera dimensión del ácido isoxazol carboxílico (magenta) en la cavidad del sitio catalítico de PTP1B (gris); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (Arg 221, Phe 182, Gln 262, Arg 24, Ser 216).	125

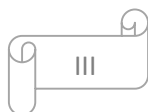
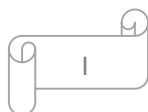


Figura 65. Visualización en segunda dimensión del ácido isoxazol carboxílico en el sitio catalítico de PTP-1B; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).	126
Figura 66. Visualización en tercera dimensión de ACB-1 (rosa) en la cavidad del sitio catalítico de PTP1B (azul); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (Arg 221, Gln 266, Ser 216).	127
Figura 67. Modo de unión de ACB-1 en el sitio catalítico de PTP1B (superficie en gris) los aminoácidos mostrados son los que participan en las interacciones polares.	127
Figura 68. Visualización en segunda dimensión de ACB-1 en el sitio catalítico de PTP1B; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).	128
Figura 69. Visualización en tercera dimensión de ACB-2 (rosa) en la cavidad del sitio catalítico de PTP1B (azul); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (Arg 221, Gln 266, Ser 216).	128
Figura 70. Modo de unión de ACB-2 en el sitio catalítico de PTP1B (superficie en gris) los aminoácidos mostrados son los que participan en las interacciones polares.	129
Figura 71. Visualización en segunda dimensión de ACB-1 en el sitio catalítico de PTP1B; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).	129
Figura 72. Visualización en tercera dimensión de TAK-875 (rosa) en la cavidad del sitio activo con los siete dominios transmembranales (colores); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (Arg 183, Tyr 91, Arg 2258 Tyr 2240).	130
Figura 73. Modo de unión de TAK-875 en el sitio activo de GPR40 (superficie en azul) los aminoácidos mostrados son los que participan en las interacciones polares.	130
Figura 74. Visualización en segunda dimensión de TAK-875 en el sitio activo de GPR40; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).	131
Figura 75. Visualización en tercera dimensión de ACB-7 (morado) en la cavidad del sitio activo con los siete dominios transmembranales (colores); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (Arg 183, Tyr 91, Arg 2258 Tyr 2240).	132
Figura 76. Modo de unión de ACB-7 en el sitio activo de GPR40 (superficie en gris) los aminoácidos mostrados son los que participan en las interacciones polares.	132
Figura 77. Visualización en segunda dimensión de ACB-7 en el sitio activo de GPR40; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).	133
Figura 78. Visualización en tercera dimensión de ACB-8 (azul) en la cavidad del sitio activo con los siete dominios transmembranales (colores); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (Arg 183, Tyr 91, Arg 2258 Tyr 2240).	134
Figura 79. Modo de unión de ACB-8 en el sitio activo de GPR40 (superficie en gris) los aminoácidos mostrados son los que participan en las interacciones polares.	134
Figura 80. Visualización en segunda dimensión de ACB-8 en el sitio activo de GPR40; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π , π - σ (línea en amarillo).	135
Figura 81. Visualización en tercera dimensión de ACB-9 (morado) en la cavidad del sitio activo con los siete dominios transmembranales (colores); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (Arg 183, Tyr 91, Arg 2258 Tyr 2240).	135
Figura 82. Modo de unión de ACB-9 en el sitio activo de GPR40 (superficie en gris) los aminoácidos mostrados son los que participan en las interacciones polares.	136
Figura 83. Visualización en segunda dimensión de ACB-9 en el sitio activo de GPR40; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π , π - σ (línea en amarillo).	136

Tabla 1. Características de los bioisómeros de la tiazolidindiona.	34
Tabla 2. Propiedades de los precursores 11-16	52
Tabla 3. Propiedades de los compuestos ACB-1-6	53
Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del compuesto 17	54
Tabla 5. Ruta de síntesis 1 de los precursores 18-20	55
Tabla 6. Condiciones de reacción y características fisicoquímicas de los precursores 18-21	57
Tabla 7. Condiciones de síntesis y características fisicoquímicas de los compuestos finales ACB-7-10	58
Tabla 8. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-1	64
Tabla 9. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-2	65
Tabla 10. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-3	66
Tabla 11. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-4	67
Tabla 12. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-5	68
Tabla 13. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-6	69
Tabla 14. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-7	70
Tabla 15. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-8	71
Tabla 16. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-9	72
Tabla 17. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-10	73
Tabla 18. Predicción de la actividad biológica con el programa PASS, de los compuestos ACB-1-10	74
Tabla 19. Predicción de la inhibición de los CYP por los compuestos ACB-1-10	77
Tabla 20. Probabilidad de bloqueo hERG de los compuestos ACB-1-10	79
Tabla 21. DL ₅₀ (mg/kg) de los compuestos ACB-1-10	80
Tabla 22. Clasificación de toxicidad por la OECD.	80
Tabla 23. Propiedades ADMET del compuesto ACB-1-10	82
Tabla 24. Blancos moleculares obtenidos mediante DIA-DB	83
Tabla 25. Porcentajes de funcionalidad de la línea celular 3T3-L1 con los compuestos de prueba (ACB-1, ACB-4, ACB-7 y ACB-9) a 1, 10, 100, 1000 μM .	85
Tabla 26. CI ⁵⁰ sobre la enzima aldosa reductasa	92
Tabla 27. CI ₅₀ de los compuestos ACB-1-3 y ACB-5-6 frente a la enzima PTP1B	99
Tabla 28. Actividad agonista de los compuestos ACB-1-10 sobre GPR40.	103
Tabla 29. Porcentaje de variación de glucemia.	112
Tabla 30. Validación acoplamiento molecular aldosa reductas del ligando cocrystalizado IDD 740 (3G5E)	113
Tabla 31. Validación de acoplamiento molecular sobre PPAR- γ	118
Tabla 32. Validación de acoplamiento molecular sobre PTP1B.	125
Tabla 33. Validación de acoplamiento molecular sobre GPR40.	130
Tabla 34. Fases móviles utilizadas para el monitoreo en CCF.	145

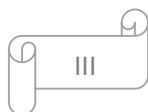


ABREVIATURAS

- ADP** Adenosín difosfato
- ADN** Ácido desoxiribonucleíco
- AF** Ácido fenilpropanoico
- AGL** Acilglicerol
- AR** Aldosa reductasa
- ATP** Adenosín trifosfato
- CCF** Cromatografía en capa fina
- CI₅₀** Concentración inhibitoria media
- CYP₄₅₀** Citocromo P450
- DAG** Diacilglicerol
- DHA** Ácido docosahexaenoico
- DL₅₀** Dosis letal media
- DM2** Diabetes mellitus 2
- DMF** *N,N*-Dimetilformamida
- DMSO** Dimetilsulfóxido
- DPP-IV** Dipeptidilpeptidasa tipo IV
- EDTA** Ácido etilendiamintetraacético
- EM** Espectrometría de masas
- FABP** Proteína de unión a ácidos grasos
- FATP** Proteína transportadora de ácidos grasos
- FDA** Food and Drug Administration
- FFAR1** Receptor de ácidos grasos libres tipo 1
- GLP-1** Péptido similar a glucagon tipo 1
- GLUT** Transportador de glucosa
- GPR40** Receptor acoplado a proteína G tipo 40
- hERG** human Ether-a-go-go related gene
- IDF** Federación Internacional de Diabetes
- IE** Impacto electrónico
- IFG** Alteración de la glucosa en ayunas



IGF	Intercambio de grupo funcional
IP₃	Inositol trifosfato
KOH	Hidróxido de potasio
LPL	Lipoproteína lipasa
MeOH	Metanol
NA	Nicotinamida
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenine dinucleótido fosfato
NaOH	Hidróxido de sodio
OECD	Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico
Pa	Probabilidad de actividad
PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PARP-1	Poli(ADP-ribosa) polimerasa tipo 1
PDB	Proteín data bank
Pi	Probabilidad de inactividad
PrKD1	Proteína kinasa D1
PLC	Fosfolipasa C
PM	Peso molecular
PPAR	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas
QSAR	Relación cuantitativa estructura-actividad
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RXR	Receptor retinoide X
SN₂	Sustitución nucleofílica bimolecular
STZ	Estreptozotocina
TNF	Factor de necrosis tumoral
TZD	Tiazolidindiona
UCP	Proteína desacoplante



RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se caracteriza por hiperglucemia crónica, lo cual deriva en múltiples complicaciones. Por esta razón los pacientes recurren a la polifarmacia; sin embargo, esto solo aborda algunos de los síntomas de la enfermedad.

Para este proyecto se tomaron en cuenta dianas farmacológicas que mejoren la sensibilidad a la insulina como PPAR- γ y PTP1B, agentes que promuevan la secreción de insulina dependiente de glucosa como los agonistas de GPR40 y moléculas que aborden las complicaciones de la DM2 como los inhibidores de la enzima aldosa reductasa. Se ha descrito una amplia variedad de compuestos de tipo tiazolidindiona (TZD) y ácido fenilpropanoico (AF) como ligandos de estas dianas. Con base en lo anterior, se diseñaron moléculas que contengan los fragmentos de TZD y AF que actúen sobre PPAR- γ , PTP-1B, GPR40 y aldosa reductasa de manera simultánea a lo cual se le ha denominado polifarmacología.

La síntesis de las benciliden-1,3-tiazolidin-2,4-dionas (serie A) se llevó a cabo mediante una sustitución nucleofílica bimolecular en medio básico y disolventes polares no próticos, posteriormente se llevó a cabo una condensación de Knoevenagel para la obtención de **ACB-1-6**. Los compuestos **ACB-7-10** (serie B) se sintetizaron a partir de una esterificación con SOCl_2 y etanol obteniendo **17**, mismo que se hizo reaccionar vía SN_2 obteniendo los precursores **18-22**. Finalmente se realizó una hidrólisis básica con KOH en donde se obtuvieron los productos **ACB-7-10**. La purificación de los compuestos se llevó a cabo mediante cromatografía en columna y ó recristalización. La identidad de los compuestos fue confirmada mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos (RMN: H^1 , C^{13} , 2D y EM: IE).

En la evaluación *in vitro* sobre PPAR- γ sobre adipocitos de la línea celular 3T3-L1 los compuestos **ACB-1** y **ACB-4** de tipo tiazolidindiona mostraron un efecto importante sobre PPAR- γ . Por otro lado los compuestos **ACB-8-9** incrementaron de manera significativa la expresión relativa de este receptor.

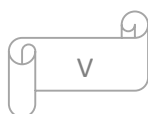
En el ensayo de inhibición sobre PTP1B los compuestos **ACB-1-3** y **ACB-5-6** mostraron Cl_{50} de 3.6 a 22 μM . Por otro lado, los compuestos de la serie de ácidos fenilpropanoicos **ACB-7-10** se comportaron como inhibidores débiles. En los ensayos *in vitro* sobre aldosa reductasa, el compuesto **ACB-5** tuvo una Cl_{50} de 11.2 μM y el compuesto **ACB-6** una Cl_{50}

de 1.9 μM siendo este el más activo de ambas series. Los compuestos **ACB-7-10** mostraron CI_{50} 7.4-30.2 μM .

En la actividad sobre GPR40 los compuestos de tipo tiazolidindiona **ACB-1-6** no mostraron efecto. El compuesto **ACB-7** de tipo ácido fenilpropanoico manifestó una CE_{50} 0.0755 μM , siendo el más potente de ambas series. Los compuestos **ACB-8-9** revelaron actividad moderada sobre este receptor y el compuesto **ACB-10** mostró baja actividad.

En los ensayos *in vivo* en un modelo murino de diabetes no insulino-dependiente (estreptozotocina y nicotinamida), los compuestos **ACB-1 y ACB-4** mostraron disminución de la glucemia *in vivo* con una reducción de hasta el 49.7 % y 55% respectivamente. El compuesto **ACB-6** mostró un efecto hiperglucémico durante la primera hora después de la administración. El compuesto **ACB-7** mostró comportamiento como antihiperglicémico. El compuesto **ACB-8** mostró actividad hipoglucemiante similar a Glibenclamida. El compuesto **ACB-9** mostró una disminución de la glucemia a partir de la hora 3 hasta la hora 7.

Los estudios de acoplamiento molecular revelaron el posible modo de unión de los compuestos más activos sobre los blancos farmacológicos planteados.



ABSTRACT

Type 2 diabetes (T2D) is characterized by chronic hyperglycemia, this usually leads to chronic complications. For this reason patients draw on to polypharmacy, increasing the risk of adverse effects and drug interactions.

One interesting target is the PPAR- γ , the agonism of this receptor results in increased insulin sensitization. In the same way, the PTP1B inhibition improves insulin sensitivity. On the other hand GPR40 is associated in the regulation of glucose-dependent insulin secretion. Moreover the aldose reductase enzyme is involved in the pathogenesis of chronic complications of T2D. It has been reported that a large variety of thiazolidinediones and carboxylic acids have activity on these targets. Based on the above, we designed molecules containing the core of thiazolidinedione and phenylpropanoic acid, to generate agents that act on PPAR- γ , PTP1B, GPR40 and aldose reductase simultaneously (polypharmacology).

For the synthesis of the benzylidene-1, 3-thiazolidin-2, 4-diones, 4-hydroxybenzaldehyde was reacted with the appropriately substituted methyl aryl halides in basic medium and non-protic polar solvents to obtain **11-16**, followed by Knoevenagel condensation to obtain the title compounds **ACB-1-6**. The compounds **ACB-7-10** were synthesized via esterification with thionyl chloride and ethanol as solvent, obtaining **17**. Subsequently, **17** was reacted with the appropriately substituted methylaryl halide in polar aprotic solvents and potassium carbonate to give compounds **18-21**. All were treated separately by basic hydrolysis with potassium hydroxide, to give **ACB-7-10**. The purification of the compounds was carried out by column chromatography and recrystallization. The identity of the compounds was confirmed by spectroscopic and spectrometric methods (NMR H^1 , ^{13}C , 2D and MS EI).

Compounds **ACB-1** and **ACB-4** induced the expression of PPAR- γ , however it did not show a significant increase in the relative expression of GLUT-4. On the other hand, the compounds **ACB-8** and **ACB-9** increase significantly the levels of relative expression for PPAR- γ and GLUT-4 mRNA's in the same way as Pioglitazone.

The evaluations against aldose reductase and PTP1B were conducted by enzyme inhibition assays. In the enzymatic inhibitory assay against PTP1B the compounds **ACB-1-3** and **ACB-5-6** presented a range of potency (IC_{50}) between 3.6-22 μM . It is noteworthy that **ACB-1-3** compounds were equipotent to ursolic acid, considered as hits. Moreover, the compounds of the phenylpropanoic acid series (**ACB-7-10**) behaved as weak inhibitors.

In vitro assay on aldose reductase showed **ACB-5** had an IC_{50} of 11.2 μ M and compound **ACB-6** an IC_{50} of 1.9 μ M, being the most active of the both series. The **ACB-7-10** compounds showed an IC_{50} in the low micromolar order. Nevertheless none of them were more active than sorbinil, a well-known aldose reductase inhibitor (1.2 μ M).

The activity on GPR40 was measured with calcium flux assay in GPR40-transfected HEK293 cells. Results revealed that thiazolidinedione compounds **ACB-1-6** were inactive against this receptor. However the phenylpropanoic acid series showed that compound **ACB-7** (3-byphenyl) was the most potent agonist displayed an EC_{50} value of 0.075 μ M, followed by compounds **ACB-8** and **ACB-9**, with substituents naphthyl and biphenylcarbonitrile, respectively. Compound **ACB-9**, with a quinolynyl substituent, provided a significant decrease in agonistic activity.

Compounds **ACB-1**, **ACB-4** and **ACB-6-8** were the most active against the targets of this work, and they were selected to tested *in vivo* at 100 mg/kg dose in a non insulin-dependent diabetes mellitus mice model. Compound **ACB-1** and **ACB-4** decreased of blood glucose by 49.7% and 55% respectively during 7h after administration. The compound **ACB-8** showed hypoglycemic activity similar to Glibenclamide. Compound **ACB-9** showed a decrease in blood glucose from hour 3 to hour 7. These compounds showed robust *in vitro* and *in vivo* efficacy, and could be considered as promising multitarget antidiabetic drug candidates.

Molecular docking studies revealed the possible binding mode of the most active compounds on these targets.

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus comprende diversos trastornos metabólicos que se manifiestan por concentraciones elevadas de glucosa en sangre, esto debido a la deficiencia de la secreción ó acción de la insulina. Por otro lado, este conjunto de padecimientos desencadena múltiples complicaciones a lo largo de la enfermedad como dislipidemias, enfermedades cardiovasculares, neuropatías y retinopatías.^{1,2}

Actualmente la diabetes es una de las enfermedades con mayor incidencia a nivel mundial. En 2017 se reportó que existen 425 millones de personas con este padecimiento, asimismo 352 millones de personas presentan alteración de la tolerancia a la glucosa corriendo un alto riesgo de desarrollar esta enfermedad. Cabe resaltar que México ocupa el quinto lugar a nivel mundial de personas con diabetes.³

Por otro lado, existe una gran variedad de fármacos para el tratamiento de la diabetes, sin embargo no ofrecen un tratamiento integral. Por tal motivo, se ha recurrido a la polifarmacia. No obstante, representa un riesgo a la salud del paciente debido a los efectos adversos de su uso; así como un mayor gasto, tan sólo en 2017 la cifra destinada al tratamiento de la diabetes ascendió a 712 mil millones de dólares del gasto mundial en atención sanitaria.

Es por esto que es necesario continuar con la búsqueda de agentes que ofrezcan un tratamiento integral para la diabetes mellitus tipo 2.

Uno de los blancos terapéuticos de gran importancia son los receptores activadores del proliferador del peroxisoma (PPAR). En este trabajo se abordará el isotipo: PPAR- γ , el cual es blanco molecular de las tiazolidindionas (glitazonas) una clase de fármaco de tipo sensibilizador de insulina.⁴

Por otro lado, el FFAR-1 (GPR40) es un miembro de la familia de los receptores acoplados a proteína-G sensible a ácidos grasos de cadena larga y media. Este receptor es altamente expresado en células pancreáticas, intestino y cerebro, está acoplado a sistemas de señalización intracelular los cuales regulan la exocitosis de insulina dependiente de glucosa.^{5,6,7} Cabe resaltar que algunos fármacos de tipo tiazolidindiona así como derivados del ácido fenilpropanoico han resultado ser agonistas de GPR40, debido a que el

farmacóforo para este receptor presenta una similitud con el de PPAR- γ , por lo que este resulta un buen blanco para el tratamiento de la diabetes.⁸

Además se tomó en cuenta a las Proteínas Fosfatasa de Tirosina (PTP's). Para este trabajo es de especial interés la PTP1B ya que su inhibición lleva a un incremento en la sensibilidad a la insulina y leptina, lo cual no sólo conduce a una mejora de los niveles de glucemia sino también resistencia a la obesidad.⁹ Existen diversos inhibidores de esta enzima, entre los que destacan algunos ácidos carboxílicos y tiazolidindionas.^{10, 11, 12} Este hecho posiciona a la PTP1B como un blanco para el tratamiento de la diabetes.

Adicionalmente se incluyó como blanco a la enzima aldosa reductasa. Esta enzima en condiciones normales está implicada en el metabolismo de glucosa a través de la vía de los polioles. Sin embargo, en la diabetes mellitus induce estrés oxidativo y daño en el tejido vascular a través de la reducción dependiente de NADPH de la glucosa a sorbitol y las consecuentes modificaciones de osmolaridad y el estado redox.^{13, 14} Lo anterior ha conducido al desarrollo de agentes inhibidores como: flavonoides e hidantoínas; sin embargo este último presenta diversos efectos adversos, dado esto, se desarrollaron bioisómeros de tipo tiazolidindiona y ácidos carboxílicos.^{15, 16, 17} Por lo tanto, la inhibición de aldosa reductasa resulta una buena alternativa como blanco terapéutico para el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones.

Con base en lo anterior, en este proyecto se plantea una serie de compuestos, tomando como núcleo la estructura de las tiazolidindionas y el ácido fenilpropanoico, con la finalidad de generar agentes que actúen sobre distintos sitios blancos PPAR- γ GPR40, PTP1B y aldosa reductasa, lo cual resulta una buena alternativa a la polifarmacia utilizada actualmente.

2. ANTECEDENTES

2.1 Diabetes

La diabetes mellitus es una enfermedad crónico-degenerativa y se le considera como un desorden metabólico endocrino. Este padecimiento se presenta por la resistencia a la insulina en tejidos periféricos, así como por deficiencia o ausencia de su secreción. Se caracteriza principalmente por la hiperglucemia y se asocia con el desequilibrio en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos.^{9,3}

Existen varios tipos de diabetes entre las que destacan

- Diabetes tipo 1
- Diabetes tipo 2
- Diabetes gestacional

En este proyecto se aborda a la diabetes tipo 2 ya que es la forma más frecuente y representa alrededor del 90% del total de casos con dicha afección.¹⁸

2.1.1 Diabetes tipo 2

Este tipo de diabetes se caracteriza por hiperglucemia, misma que es el resultado de una producción inadecuada de insulina y la incapacidad del organismo de responder a esta hormona, lo anterior se define como resistencia a la insulina ^{1, 3}. Aunado a esto, la enfermedad a menudo está asociada a complicaciones como obesidad, dislipidemias, hipertensión, aterosclerosis, neuropatías, nefropatías y retinopatías.¹⁹ Por otro lado los pacientes con diabetes con frecuencia desarrollan infecciones que disminuyen su esperanza y calidad de vida.

Cabe mencionar que este tipo de diabetes se ve con mayor frecuencia en adultos mayores; sin embargo cada vez tiene más incidencia en niños, adolescentes y adultos jóvenes debido al aumento de personas con obesidad por falta de actividad física y la mala alimentación.

2.2 Epidemiología

La diabetes es una de las mayores emergencias sanitarias a nivel mundial de este siglo. Se calcula que alrededor de 425 millones de personas; es decir el 8.8% de la población en edades de 20 a 79 años sufren de esta enfermedad y se estima que para el año 2045 existan 629 millones de pacientes con diabetes (Figura 1).

Además se encuentra entre las 10 principales enfermedades no transmisibles (enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades respiratorias). Asimismo la diabetes ha sido responsable del 10.7% de la mortalidad mundial superando la suma de

fallecimientos por las principales enfermedades infecciosas (1.1 millones de muertes por VIH/SIDA, 1.8 millones por tuberculosis y 0.4 millones por malaria en 2015).

Para el 2017 se estima que alrededor de 4 millones de personas de entre 20 y 79 años morirán de diabetes.

Por otro lado, la enfermedad genera un gran impacto económico con un gasto anual de 727 millones de dólares tan solo en asistencia sanitaria, lo que corresponde a uno de cada ocho dólares empleados en sanidad.³

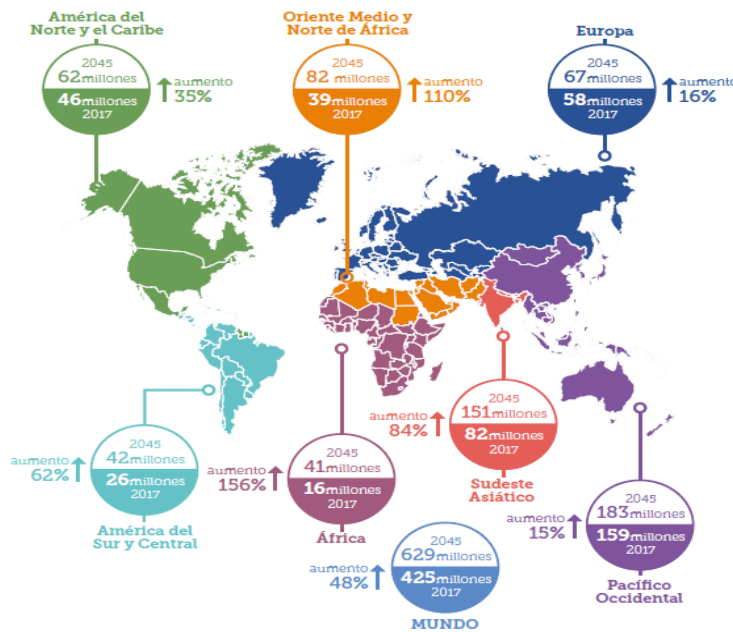


Figura 1. Número de personas con diabetes en todo el mundo y por región en 2017 y 2045 (20-79 años).³

Existen diversos signos y síntomas que se derivan del estado de hiperglucemia crónica en la DM2. A continuación se mencionan algunos de los más característicos.

2.3 Signos y síntomas

Los altos niveles de glucemia poseen varios efectos en un paciente diabético. La elevación de glucosa provoca una mayor filtración de esta al túbulo renal de la que puede ser absorbida, eliminando el exceso a través de la orina lo que es conocido como glucosuria. A su vez, esta pérdida provoca diuresis osmótica, dando como resultado un aumento en el volumen y en la frecuencia de micción (poliuria). Debido a la pérdida constante de líquidos las personas con DM2 tienen una gran necesidad ingerir líquidos (polidipsia). Por otro lado a pesar de que existen altos niveles de glucosa, esta no es usada con fines energéticos por lo que hay una mayor utilización y un menor almacenamiento de lípidos y proteínas lo que se manifiesta con una rápida pérdida de peso y falta de energía aunque consuman grandes cantidades de alimento, lo cual se conoce como polifagia.²⁰

Es importante mencionar que los pacientes que presentan estos signos y síntomas, manifiestan un daño de aproximadamente del 50-60% de las células β - pancreáticas^{21, 22}, por lo que el diagnóstico suele ser tardío. Lo anterior trae como consecuencia que entre un tercio y la mitad de casos de diabetes tipo 2 de la población estén sin diagnosticar, ya que la enfermedad es asintomática durante varios años. Por tal motivo se han establecido varios parámetros para un diagnóstico oportuno.

2.4 Diagnóstico

Existen varias condiciones que se deben cumplir antes de diagnosticar como diabetes.

2.4.1 Prediabetes

Se considera prediabetes cuando los niveles de glucosa son anormales en ayuno y existe intolerancia a la glucosa, ya sea de manera aislada o combinados. Los pacientes con prediabetes tienen un mayor riesgo de presentar diabetes tipo 2 y otras complicaciones.

2.4.2 Criterios de diagnóstico^{3, 23, 24}

Se debe diagnosticar diabetes cuando se cumplan uno o más de los siguientes criterios:

- Glucosa en plasma en ayunas ≥ 7.0 mmol/L (126 mg/dL)
- Glucosa en plasma tras dos horas de haber ingerido por vía oral una carga de glucosa de 75 g.
- El nivel de glucosa al azar > 11.1 mmol/L (200 mg/dL) o la HbA1c ≥ 48 mmol/L (6.5%).

Se debe diagnosticar la alteración de tolerancia a la glucosa cuando se cumplan ambos criterios:

- La glucosa en plasma en ayunas < 7.0 mmol/L (126 mg/dL).
- La glucosa en plasma tras dos horas de haber ingerido por vía oral una carga de glucosa de 75 g de 7.8-11.1 mmol/L (140-200 mg/dL).

Se debe diagnosticar alteración de la glucemia en ayunas cuando se cumplan ambos criterios

- La glucosa en plasma en ayunas 6.1-6.9 mmol/L (110-125 mg/dL).
- La glucosa en plasma tras dos horas de haber ingerido por vía oral una carga de glucosa de 75 g < 7.8 mmol/L (140 mg/dL).

2.5 Fisiopatología de la DM2

La diabetes tipo 2 como ya se ha mencionado anteriormente se caracteriza por defectos en la secreción de insulina; así como la resistencia a esta en tejidos periféricos como músculo esquelético, tejido adiposo y el hígado. Lo anterior trae como consecuencia un mecanismo compensatorio de las células β -pancreáticas en etapas tempranas de la enfermedad, causando hiperinsulinemia seguido de una incorrecta señalización de la insulina (resistencia a la insulina) y por lo tanto hiperglucemia.

2.5.1 Señalización de la insulina

En la cascada normal de señalización de la insulina esta activa a su receptor lo que lleva a una fosforilación en el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1) en el músculo esquelético y el tejido adiposo, así como en el sustrato del receptor de insulina 2 (IRS2) en el hígado, activando a la fosfoinositol 3-cinasa (PI3K) que promueve la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) hacia la membrana. Este transporta la glucosa plasmática al interior de la célula normalizando la glucemia. Sin embargo en la DM2 existe una inadecuada señalización de la insulina. Dicha afección en la señalización se asocia principalmente al aumento de ácidos grasos libres, por lo que se han descrito varios mecanismos.

2.5.1 Mecanismos de señalización implicados en la resistencia a la insulina

En estados de obesidad y DM2 existe un proceso inflamatorio crónico de bajo grado, el cual se relaciona con el tejido adiposo (TA), ya que se le han atribuido varias funciones para mantener la homeostasis vascular, metabólica, endocrina e inmunológica.

La presencia de una mayor cantidad de ácidos grasos libres crea un balance de energía positivo lo que ocasiona que los adipocitos los almacenen, hipertrofiándolos causando hipoxia celular, apoptosis y estrés celular seguido del reclutamiento de macrófagos, células T y B. Además, se observa un incremento de leptina promoviendo la secreción de $\text{IFN-}\gamma^{25}$ y este a su vez la expresión de MHCII, lo que sugiere que los propios adipocitos pueden participar en la activación inmune. Finalmente los macrófagos entran mitosis en el tejido adiposo inflamado y permanecen ahí en lugar de migrar a la linfa, debido a la mayor expresión de netrina 1, la cual está asociada con la migración celular (Figura 2).^{26, 27}

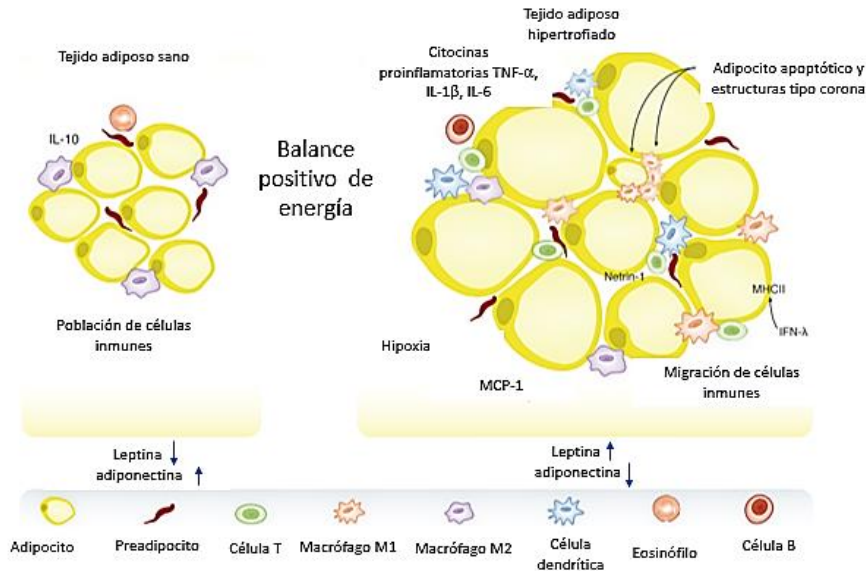


Figura 2. Tejido adiposo sano e hipertrofiado. Modificado de ²⁸

Lo anterior causa un incremento en la actividad del retículo endoplásmico lo que conduce a la activación de NF- κ B. Este es un factor de transcripción inducible que participa en la respuesta inmune y en la respuesta inflamatoria, activando un gran número de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) y suprime otras como la adiponectina cuyas propiedades antiinflamatorias son ejecutadas a través de su acción sobre el NF- κ B y sus niveles correlacionan de manera inversa en pacientes con obesidad, diabetes tipo 2. ²⁹ y con los transportadores de glucosa tipo 4 (GLUT-4).²⁸

Además el incremento en la captura de glucosa por las células endoteliales del tejido adiposo causa un exceso de especies reactivas de oxígeno en las mitocondrias, provocando daño oxidativo y activando señales de inflamación dentro de la célula endotelial. El daño endotelial en el TA causa quimiotaxis de macrófagos y exagera aún más la inflamación local. La hiperglucemia también estimula la generación de especies reactivas de oxígeno en los adipocitos, con lo cual se incrementa la producción de citocinas proinflamatorias.^{28, 30}

La resistencia a la insulina en el músculo esquelético e hígado dada por una acumulación ectópica de FFA así como sus metabolitos diacilglicerol (DAG) y acetilcoenzima A aumentan los niveles de TNF- α , mismo que inhibe la fosforilación del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) en los residuos de serina. A su vez, la falta de activación de serina del IRS-1 reduce la fosforilación de tirosina del IRS-1 una vez que la insulina se ha unido a su receptor, teniendo como resultado un decaimiento en la translocación de GLUT4.²⁸ Todos

estos procesos son la causa más frecuente de las complicaciones crónicas en los pacientes diabéticos

2.6 Complicaciones de la DM2

La exposición crónica a niveles altos de glucosa causa daño en ciertos tejidos como las células capilares endoteliales, la retina, células mesangiales del glomérulo renal, neuronas y células de Schawn en los nervios periféricos. Lo anterior trae como consecuencia el desarrollo de complicaciones, las cuales son ocasionadas por el estrés oxidativo mismo que promueve la liberación de ROS, esto a su vez activa la vía de los polioles seguido de la formación de productos de glicación avanzada, la activación de la proteína quinasa C, aumento de la vía de las hexosaminas, seguido de inflamación. Desencadenando la inducción de factores de transcripción, modificación en genes, histonas, cromatina y metilación en el ADN. Cabe mencionar que la transcripción de genes en presencia de ROS favorece la hipertrofia, proliferación, remodelación y apoptosis celular en los tipos celulares anteriormente mencionados.^{31, 32}

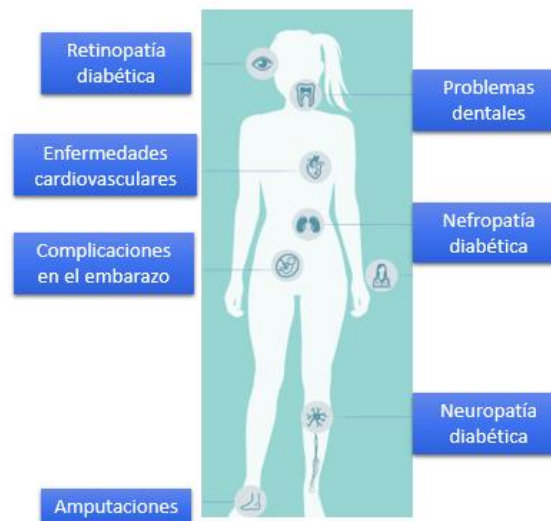


Figura 3. Principales complicaciones de la DM. Modificado de ³

Las complicaciones se dividen en microvasculares y macrovasculares.

2.6.1 Complicaciones macrovasculares

Se refiere a condiciones como la enfermedad isquémica cardíaca, enfermedad vascular periférica enfermedad cerebrovascular, enfermedad coronaria arterial, enfermedad arterial periférica.³³

2.6.2 Complicaciones microvasculares

Las complicaciones microvasculares suceden en tejidos en donde la captación de glucosa es independiente de insulina como el riñón, retina y endotelio vascular y se divide en neuropatía, retinopatía y nefropatía diabética.³⁴

Es importante mencionar que todas estas afecciones a menudo son irreversibles y su tratamiento es bastante complejo.

2.7 Tratamiento farmacológico DM2

2.7.1 Inhibidores de la gluconeogénesis hepática (biguanidas)

De acuerdo a la ADA estas forman parte del tratamiento de primera elección para la DM2, ya que no poseen riesgo de hipoglucemia y pueden ser utilizadas en pacientes obesos. Las primeras biguanidas Metformina y Fenformina fueron introducidas en 1957; sin embargo, la última fue retirada del mercado por acidosis láctica. La Metformina por otro lado es la única de su clase que se encuentra comercialmente disponible (Figura 4).³⁵

Este fármaco presenta un efecto antihiper glucémico, al inhibir la gluconeogénesis hepática y mejora la sensibilidad a la insulina a nivel hepático y muscular³⁶, lo anterior está dado por un incremento en la actividad del receptor de insulina y la translocación de GLUT-4³⁷, asimismo disminuye la glucosa posprandial. Su mecanismo de acción se basa en la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), como resultado de esto decrece la actividad de la acetil-CoA carboxilasa induciendo la oxidación de ácidos grasos y reduciendo la expresión de enzimas lipogénicas a través de la supresión de SREBP-1 (factor de transcripción lipogénico).³⁸

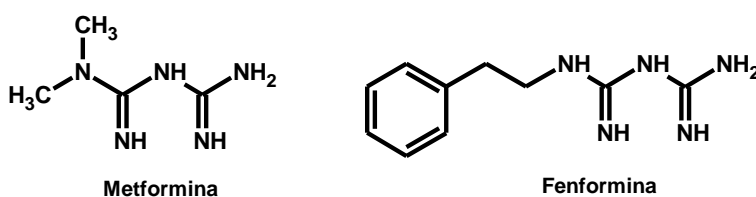


Figura 4. Biguanidas

2.7.2 Sulfonilureas

Las sulfonilureas (SU) fueron los primeros fármacos antidiabéticos orales utilizados. La Tolbutamida fue introducida en 1956 en Alemania. Posteriormente se desarrollaron las SU de primera generación como la Clorpropamida, de segunda generación Glibenclamida (Gliburida) y Glipizida y de tercera generación Glimpirida y Glicazida (Figura 6). No obstante su uso se ha limitado debido a que incrementa el riesgo de eventos cardiovasculares, hipoglucemia y aumento en el peso corporal.³⁶ Su mecanismo de acción

se basa en su unión al receptor 1 de sulfonilureas (SUR)1 del complejo Kir.6.2/SUR en la membrana de la células β -pancreáticas, bloqueando los canales de potasio (K^+) sensibles a ATP, seguido de una despolarización de la membrana, lo cual provoca la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, de este modo se lleva a cabo la translocación de gránulos de insulina disminuyendo la glucemia.³⁶

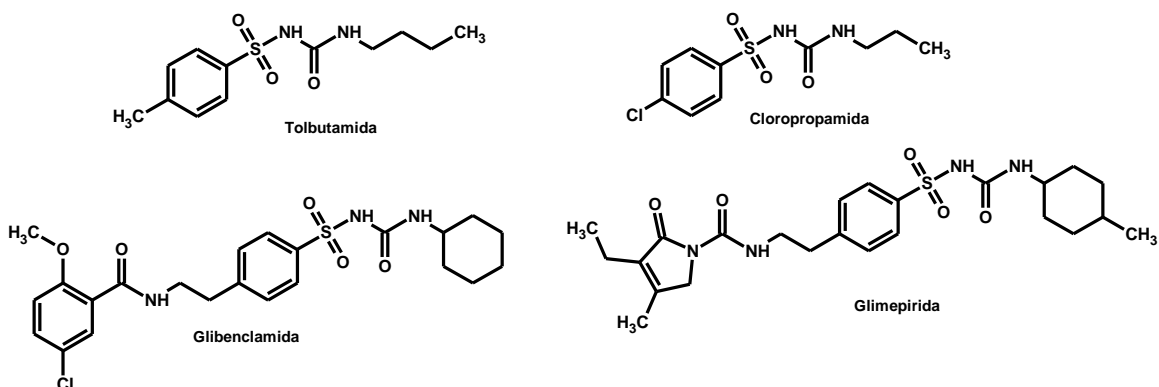


Figura 5. Sulfonilureas de primera, segunda y tercera generación.

2.7.3 Meglitinidas o glinidas

En este grupo de fármacos se encuentran la Repaglinida, Mitiglinida que son derivados del ácido benzoico y Nateglinida que es un derivado de fenilalanina (Figura 6). Las meglitinidas son agentes hipoglucemiantes que actúan de manera similar a las SU, sin embargo se unen en un sitio alostérico de SUR1. Las meglitinidas tienen una baja vida media en comparación con las SU debido a que la afinidad hacia su receptor es menor y a la rápida disociación de este.^{39, 40, 34}

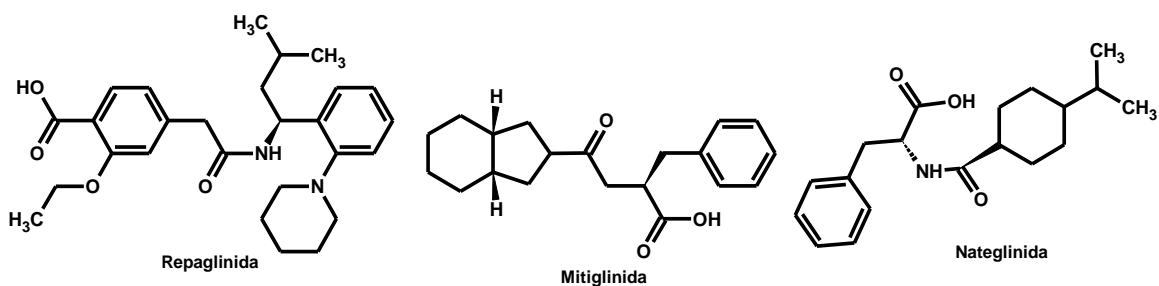


Figura 6. Meglitinidas

2.7.4 Inhibidores de alfa-glucosidasas

La Acarbose y el Miglitol (Figura 7) son los inhibidores más utilizados. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición competitiva y reversible de la enzima alfa-glucosidasa que

está presente en las células del intestino delgado (borde en cepillo), esta se encarga de metabolizar los oligosacáridos en carbohidratos más sencillos para la obtención de energía. Su principal efecto es la disminución de la glucemia posprandial mejorando la liberación de insulina mediada por glucosa. Además la captación de triglicéridos en los adipocitos y la lipogénesis hepática también se reducen.⁴¹ Por otro lado, se observa una menor pérdida de glucosa en la orina, una mejora en la actividad de GLUT4 en el músculo esquelético, así como una disminución en los productos finales de glicación avanzada (AGEs).³⁶

Debido a su mecanismo de acción no se presenta riesgo de hipoglucemia. Los efectos adversos que más se manifiestan son dolor abdominal, diarrea y flatulencias debido a carbohidratos no digeridos en el intestino distal.⁴²

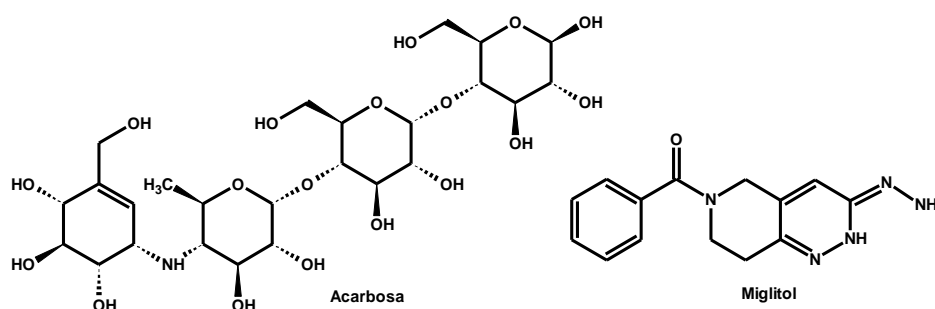


Figura 7. Inhibidores de la enzima alfa-glucosidasa

2.7.5 Agonistas de GLP-1

Existen dos tipos de agonistas del receptor de GLP-1 los de corta acción como Exenatida y Lixisenatida y los de larga acción como Exenatida modificada, Liraglutida, Dulaglutida y Albiglutida. Los de corta acción son más efectivos para la hiperglicemia posprandial; mientras que los de acción larga mejoran la hiperglicemia basal. La Exenatida fue el primer agonista de GLP-1, es una forma sintética de exendin-4 que se aisló de la saliva de monstruo de Gila. Normalmente se utiliza sola o en combinación con Metformina, sulfonilureas, tiazolidindionas e inhibidores del cotransportador de sodio glucosa tipo 2 (SGLT2). Su mecanismo de acción se basa un efecto incretino-mimético, en particular del péptido similar a glucagón (GLP-1) y el polipéptido insulínico dependiente (GIP), estos son liberados 5-10 min de la ingestión de alimentos y son metabolizados por la enzima dipeptidilpeptidasa tipo 4 (DPP-4). Al unirse con los receptores de GLP-1 que se expresan en los islotes pancreáticos se estimula la secreción de insulina e inhibe la secreción de glucagón. También se retarda el vaciamiento gástrico y reduce la ingesta de alimentos.³⁶

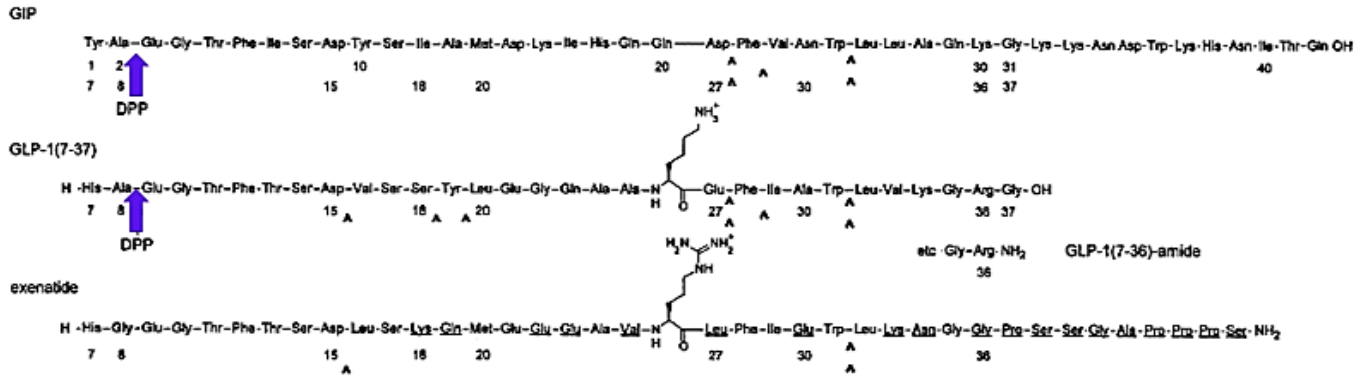


Figura 8. Secuencia de los agonistas de GLP-1. Con una flecha se indica el lugar en donde la DPP4 corta la cadena peptídica.

2.7.6 Inhibidores de DPP4

Entre estos fármacos destacan Sitagliptina, Saxagliptina, Alogliptina (Figura 9) y Linagliptina los cuales fueron aprobados entre 2006 y 2013 en USA. Por otro lado Vildagliptina se ha aprobado en varios países para su uso. Se utilizan como monoterapia o en combinación con otros agentes antidiabéticos. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la DPP4, esta enzima ejerce su función sobre la degradación de GLP-1, GIP, polipéptido pancreático PP, quimiosinas y la sustancia P, lo cual incrementa la secreción de insulina de manera dependiente a los niveles de glucosa, además reduce la secreción de glucagón.^{43,44} Los principales efectos adversos de estos fármacos son hipoglucemia infecciones respiratorias y del tracto urinario, así como pancreatitis aguda, hemorrágica y necrotizante.⁴⁵

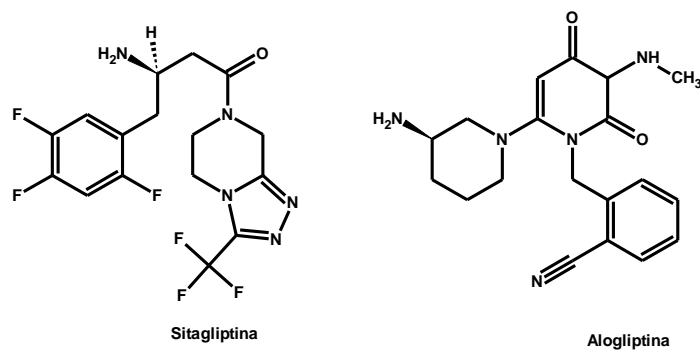


Figura 9. Inhibidores de DPP4

2.7.7 Inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2)

Los inhibidores del cotransportador de sodio glucosa tipo 2 (SGLT2) proporciona una alternativa para tratar la hiperglucemia a través de la excreción urinaria de glucosa. Este tipo de fármacos incluyen a la Canaglifozina, Dapaglifozina (Figura 10) y Empaglifozina. Se

encuentran disponibles como monoterapia o en combinación con Metformina, inhibidores de DPP4 inclusive insulina.^{46, 36} La reabsorción de glucosa en condiciones normales ocurre a través de SGLT2, impidiendo que se deseche la glucosa por la orina (glucosuria). SGLT2 es responsable del 90% de la reabsorción de glucosa y actúa de manera independiente a la insulina, se expresa en la superficie luminal de las células epiteliales que recubren el segmento S1 del túbulo contorneado proximal de los riñones.⁴² El mecanismo de acción de estos fármacos se basa en la inhibición competitiva de SGLT2, lo cual permite eliminar de 60 a 90 g de glucosa por día mejorando la glucemia.⁴⁷ Algunos de sus principales efectos adversos se relacionan con cetoacidosis e infecciones en el tracto urinario debido a la glucosa presente en la orina.

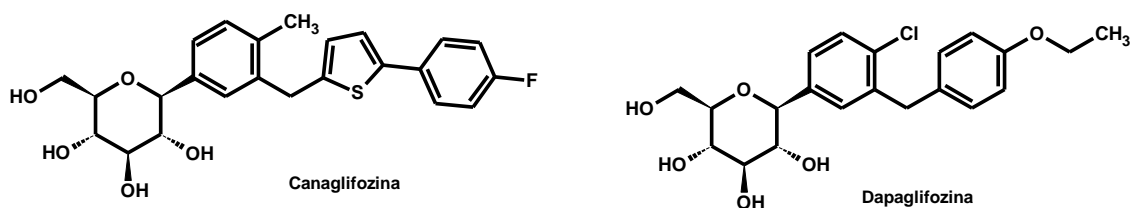


Figura 10. Inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2)

2.8 Tiazolidindionas o glitazonas

Este tipo de moléculas actúan mejorando la sensibilidad a la insulina principalmente en tejido adiposo, hígado y músculo esquelético. Este efecto es provocado por su unión a los receptores activados por el proliferador de peroxisomas-gamma (PPAR- γ). Los fármacos más representativos de este grupo son Rosiglitazona y Pioglitazona (Figura 11); no obstante Rosiglitazona se asoció con cardiotoxicidad y edemas, tanto que en 2011 la agencia europea médica recomendó la suspensión de este medicamento del mercado y por su parte la FDA puso restricciones para la prescripción del mismo.⁴⁷

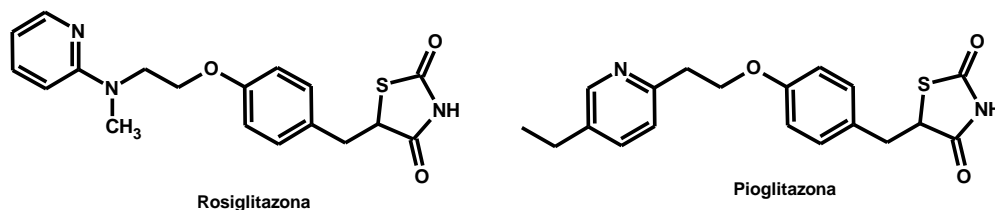


Figura 11. Agonistas PPAR- γ

2.8.1 Receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR)

Los receptores de proliferador de peroxisomas son factores de transcripción nucleares que están involucrados en el metabolismo de glucosa, lípidos, la proliferación y diferenciación

celular y cáncer⁴⁸, además participa en los procesos inflamatorios, lo cual los hace un excelente target para el tratamiento de la DM2. Existen tres isotipos de estos receptores PPAR- α (NR1C1), PPAR- β/δ (NR1C2) y PPAR- γ (NR1C3).

En este proyecto se abordó el isotipo γ ya que su agonismo resulta principalmente en una mejora en la sensibilidad a la insulina. Este receptor tiene 2 isoformas, PPAR- γ 1 que se expresa en las células β -pancreáticas, el bazo, intestino y tejido adiposo blanco; mientras que PPAR- γ 2 es altamente expresado en el tejido adiposo pardo.⁴⁹ Cabe mencionar que los agonistas tradicionales de PPAR- γ son agonistas totales y se han utilizado como insulinosensibilizadores, sin embargo se han asociado a efectos adversos como cardiotoxicidad, aumento de peso, edema, fracturas y cáncer^{50, 51, 53, 54} razón por la cual se optó por el desarrollo de agonistas parciales.

2.8.2 ligandos endógenos PPAR- γ

PPAR- γ tiene una gran variedad de ligandos endógenos, los cuales suelen ser agonistas totales incluyendo ácidos grasos insaturados de cadena larga (12-18 carbonos) como el ácido docosahexaenoico (DHA). También se han reportado como sus ligandos algunos eicosanoides, endocannabinoides, fosfolípidos, derivados de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (oxLDL) como el ácido hidroxieicosatetraenoico (15-HETE), ácido 13-ceto-9Z,11E-octadecadienoico (13-oxo-ODE), así como 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J2 y el ciclo ácido fosfatídico (Figura 12).^{54, 55} Por otro lado existe una gran variedad de ligandos sintéticos que pueden actuar como agonistas parciales.

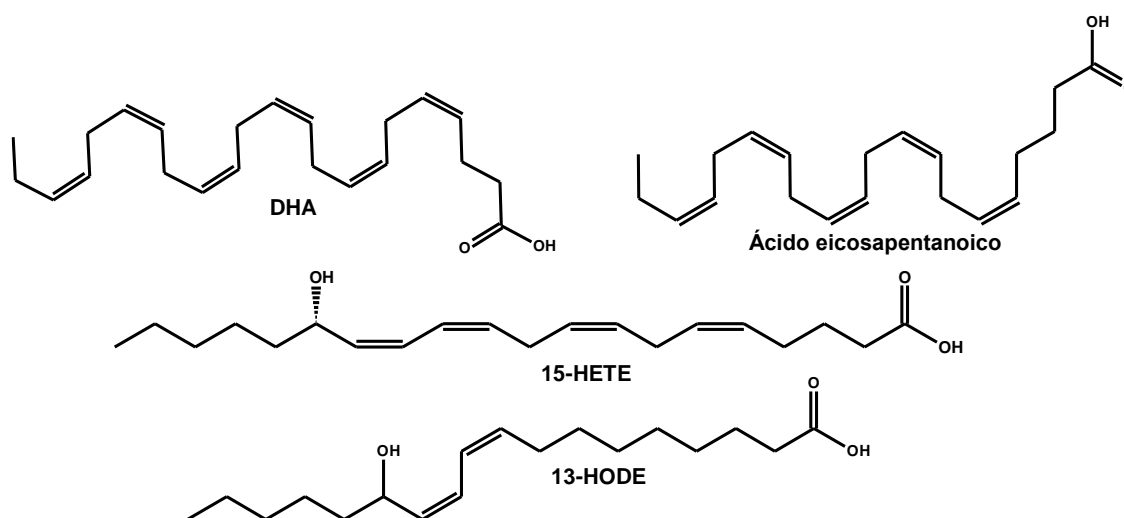


Figura 12. Ligandos endógenos PPAR- γ

2.8.2 Mecanismo molecular

PPAR- γ está localizado dentro de la célula diana en el retículo endoplásmico; la interacción con sus ligandos (endógenos o sintéticos) resulta en la traslocación al núcleo y la modificación en la regulación de la transcripción de genes. La unión de un ligando a PPAR- γ puede resultar en la transactivación o transrepresión de algunos genes de interés. En el proceso de transactivación dependiente de ADN, la unión de un ligando produce la heterodimerización de PPAR- γ con el receptor retinoide X (RXR) y el reconocimiento de los elementos de respuesta (PPREs) en la región promotora de los genes blanco. Esto conduce a un cambio conformacional que resulta en el reclutamiento de coactivadores o corepresores que interactúan con el receptor nuclear de forma dependiente de ligando provocando la transcripción o represión de algunos genes blanco.

La activación del receptor PPAR- γ promueve el almacenamiento de ácidos grasos libres en los adipocitos, con lo cual hay una mejora en la sensibilidad a la insulina. Por otro lado se manifiesta un incremento de la transcripción de GLUT-4 en el tejido adiposo y músculo esquelético aumentando la captación de glucosa de 10 a 20 veces⁵⁶. Asimismo se incrementa la expresión de CD36, un transportador de ácidos grasos que está relacionado en el control de sensibilidad a la insulina. Además PPAR- γ regula de manera negativa a NF- $\kappa\beta$ factor nuclear que promueve la transcripción de citocinas proinflamatorias como TNF- α que contribuye a la resistencia a la insulina a través de la vía Ser/Thr, IL-6 e IL-1 β .^{54,57-60} A su vez en el tejido adiposo PPAR- γ aumenta la lipoproteína lipasa y la UCP-1-3⁴⁹ mitocondrial implicada en procesos termogénicos. Aunado a lo anterior, la activación de este receptor disminuye adipocitocinas como la resistina y aumenta la adiponectina. En el endotelio disminuye moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) y quimiotácticas (Figura 13).

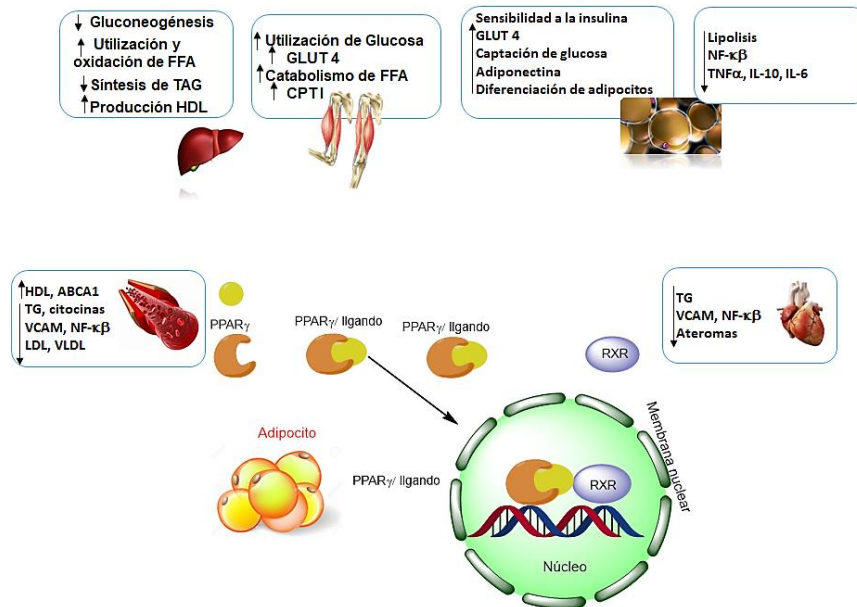


Figura 13. Mecanismos implicados en la activación de PPAR- γ . Modificado de ⁵⁰

2.8.2 Ligandos sintéticos PPAR- γ

Existen varios agonistas sintéticos de estos receptores, tal es el caso de Saroglitazar que actúa sobre PPAR- α/γ ; para su diseño el fragmento de tiazolidindiona fue reemplazado por un ácido carboxílico (bioisótero).⁶¹ Elafibranor es otro bioisótero de tiazolidindiona desarrollado por Genfit para el tratamiento de desórdenes metabólicos incluyendo diabetes, insulinoresistencia y dislipidemias.⁶² Lobeglitazona es un antidiabético aprobado en Korea actúa como agonista PPAR- α/γ . Chiglitazar contiene un núcleo carbazol y es un derivado del ácido fenilpropanoico se encuentra en fase clínica III en china.⁴⁷

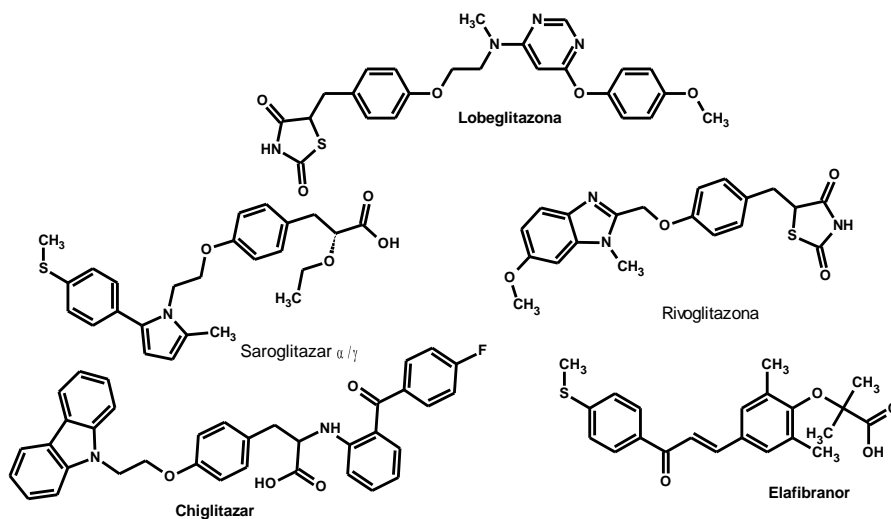


Figura 13. Ligandos sintéticos PPAR- γ

Existe un mecanismo que relaciona a la activación de PPAR- γ con la del receptor acoplado a proteína G tipo 40 (GPR40) en el endotelio humano. De manera tradicional los ligandos de PPAR- γ se unen directamente a él induciendo un cambio conformacional, este cambio resulta en la disociación de sus corepresores e histonas desacetilasas, así mismo promueve el reclutamiento de coactivadores como la proteína coactivadora 1 (PGC1) y EP300. Por otro lado, se ha demostrado que Rosiglitazona (agonista PPAR- γ) y otros ligandos pueden activar a GPR40 principalmente en el endotelio.⁶³ Lo anterior resulta en la fosforilación de p38 MAPK⁶⁴, este a su vez fosforila y activa a PGC1 y EP300. Seguido de esto PGC-1 se desacetila por acción de SIRT1, lo cual es esencial para su activación. Esta fosforilación libera a PGC1 de su represor p160^{MBP} causando un cambio conformacional que provoca el acoplamiento de PGC1 a PPAR y el reclutamiento de EP300 activado. EP300 es una histona desacetilasa que remodela la cromatina y permite la transcripción de genes. El complejo activado PPAR se heterodimeriza con el receptor retinoide X, que se une a elementos de respuesta de PPAR induciendo la transcripción de los genes blanco (Figura 14).⁶⁵

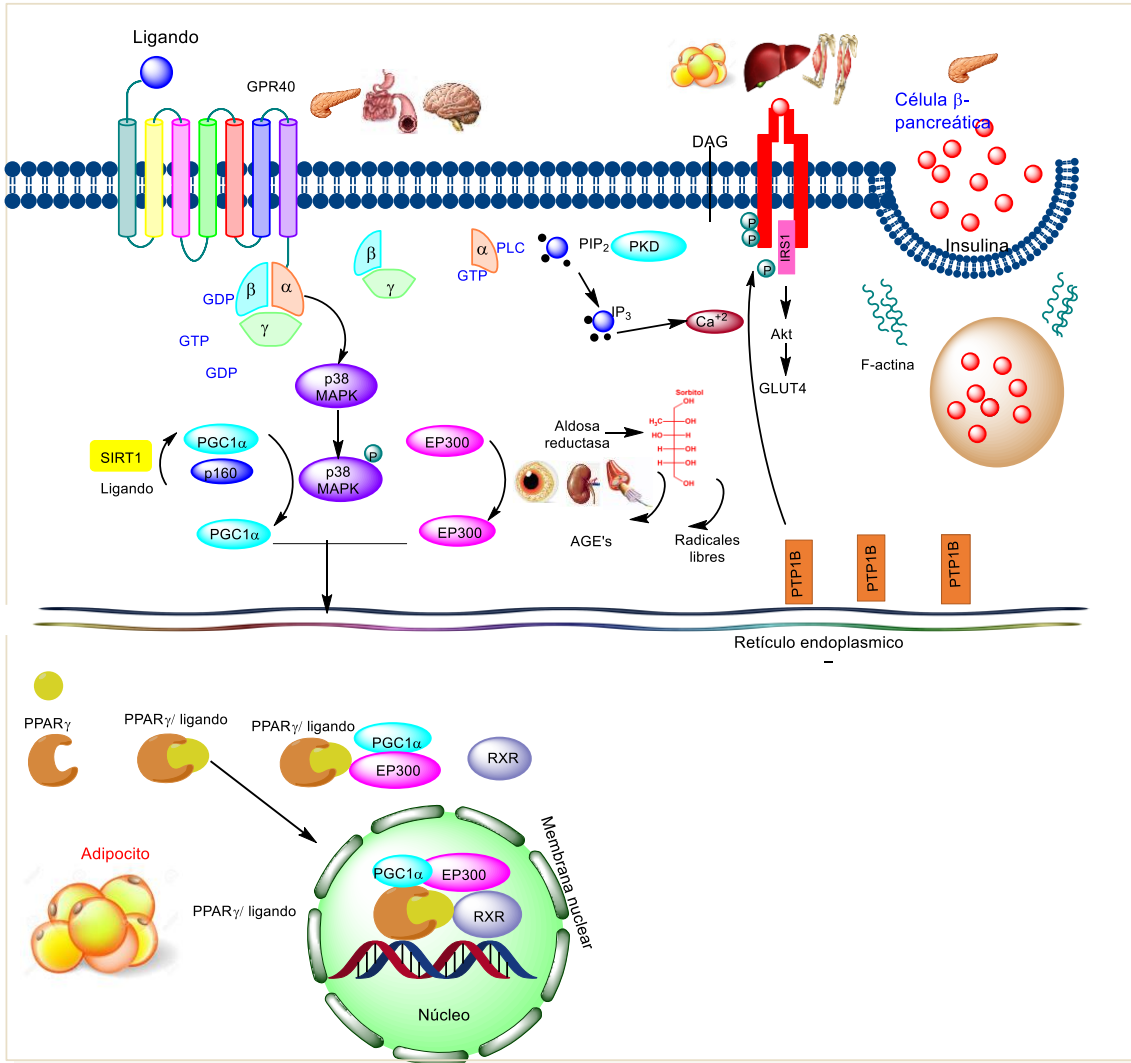


Figura 14. Convergencia de rutas PPAR- γ , GPR40, PTP1B y AR. Modificado de.⁶⁵

En la Figura 14 se observa la convergencia de las rutas de PPAR- γ y GPR40. Por otro lado se muestran los tejidos en donde se encuentran localizadas las enzimas AR y PTP1B; así como su señalización y principales efectos sobre la DM2.

2.9 GPR40 (FFA1)

GPR40 (FFA1) es un receptor (rodopsina) de siete dominios transmembranales que se acopla a la proteína G heterotrímica $G_{\alpha_q/11}$ de clase A. Está ampliamente expresado en las células β -pancreáticas, en las células enteroendocrinas I, K y L, así mismo se ha reportado su presencia en el cerebro.⁶

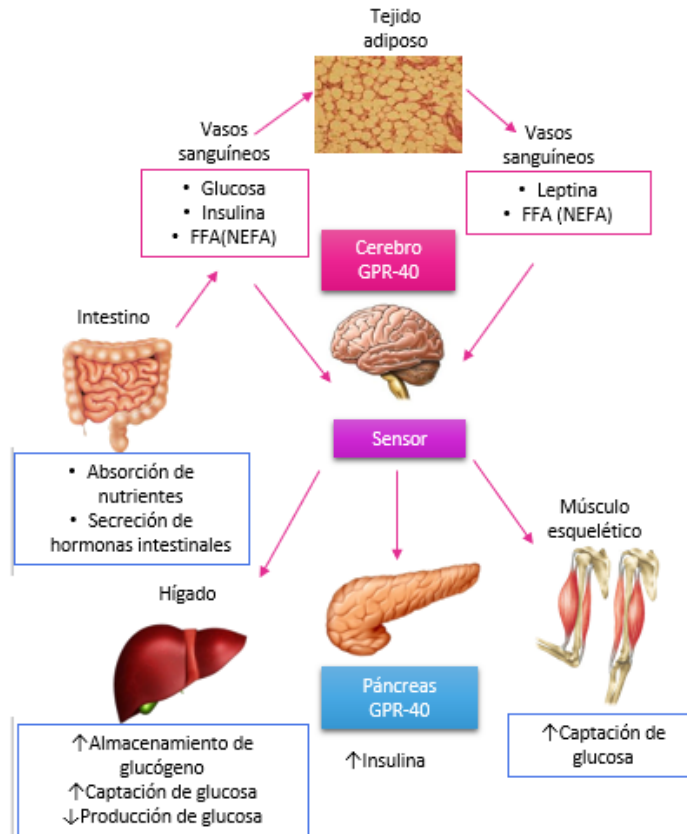


Figura 15. Expresión y efectos de GPR-40 en diferentes órganos. Modificado de^{14, 66, 67}

La glucemia requiere de una buena coordinación de la secreción de insulina de las células β -pancreáticas, esto es mediado por la misma glucosa y de manera secundaria se potencia por la presencia de ácidos grasos libres (NEFA) vía GPR40.

2.9.1 Mecanismo molecular GPR40

La estimulación de secreción de insulina mediada por glucosa ocurre en dos fases. La primera fase de secreción de insulina es rápida ocurre por la liberación de los gránulos que están disponibles para su liberación y están asociados a la membrana. Por otro lado, la secreción de insulina más lenta pero prolongada (2ª fase) ocurre vía GPR40. En la Figura 16 se muestra la unión de un ligando a GPR40 en donde ocurre un intercambio de GDP por GTP en $G\alpha_{q/11}$, a su vez la subunidad α se disocia de la subunidad β/γ lo que promueve la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato por la fosfolipasa C a los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP3). De manera consecutiva DAG activa a la proteína quinsa C, mientras IP3 moviliza el calcio almacenado en el retículo endoplásmico. Este efecto es dependiente de DAG y la subsecuente activación de la proteína quinasa sensible a DAG (PrKD1). La estimulación de PrKD1 promueve la

remodelación cortical de fibras de F-actina lo que permite la traslocación de gránulos de insulina.^{6, 66} Por otro lado los ligandos endógenos de GPR40 son ácidos grasos de cadena larga a media como el ácido decanoico, ácido linoleico y ácido docosahexaenoico (DHA) son agonistas totales de GPR40. Lo anterior resulta muy importante ya que implica no sólo la liberación de insulina dependiente de glucosa sino también la secreción de GLP-1 y GIP, incorporando los efectos beneficiosos de las terapias de fármacos incretinomiméticos (incluyendo saciedad, cardioprotección, supresión de niveles de glucagón y pérdida de peso).

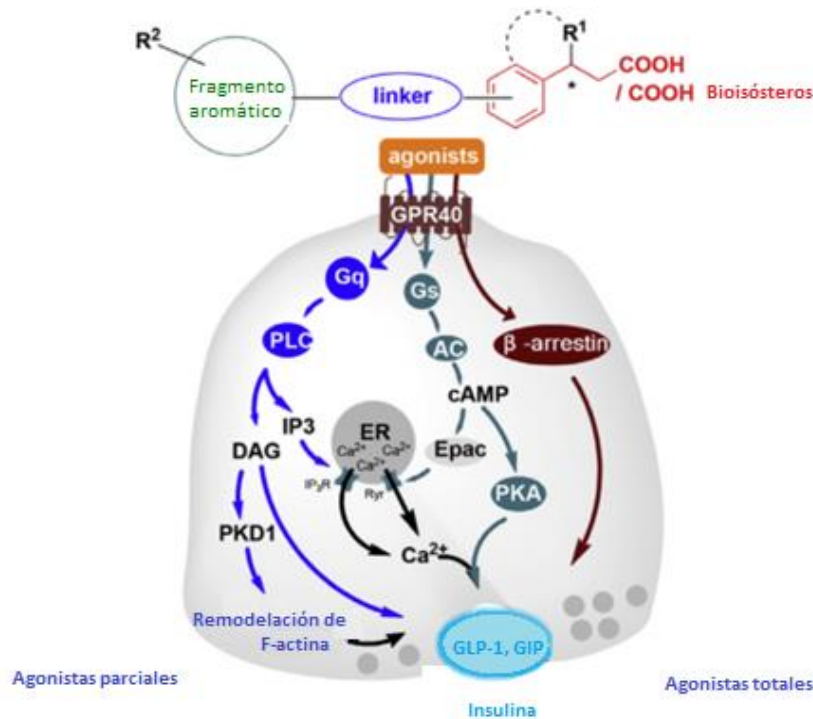


Figura 16. Mecanismo molecular de liberación de insulina vía GPR40 por agonistas totales y parciales.⁶⁸

Por otro lado, se ha reportado que la activación de GPR40 en varias afecciones neuropatológicas, como apoptosis, dolor inflamatorio, la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer (EA)⁶⁹ y depresión disminuye la pérdida neuronal⁷⁰. Cabe mencionar que la EA se ha relacionado ampliamente con la DM2 y se ha propuesto denominarla como Diabetes tipo 3, debido a que se ha observado hiperinsulinemia y resistencia a la insulina en pacientes con estas enfermedades. Lo anterior está ligado con la secreción de insulina ya que esta se cosecreta con amilina, este péptido es el principal componente de placas amiloides (Aβ) en las células β-pancreáticas y el cerebro, provocando disfunción y destrucción de la población celular. Asimismo la insulina participa en la activación de la glucógeno sintasa quinasa 3β (GSK3β), que a su vez causa la

fosforilación de tau, que interviene en la formación de los ovillos neurofibrilares (Figura 17).⁷¹

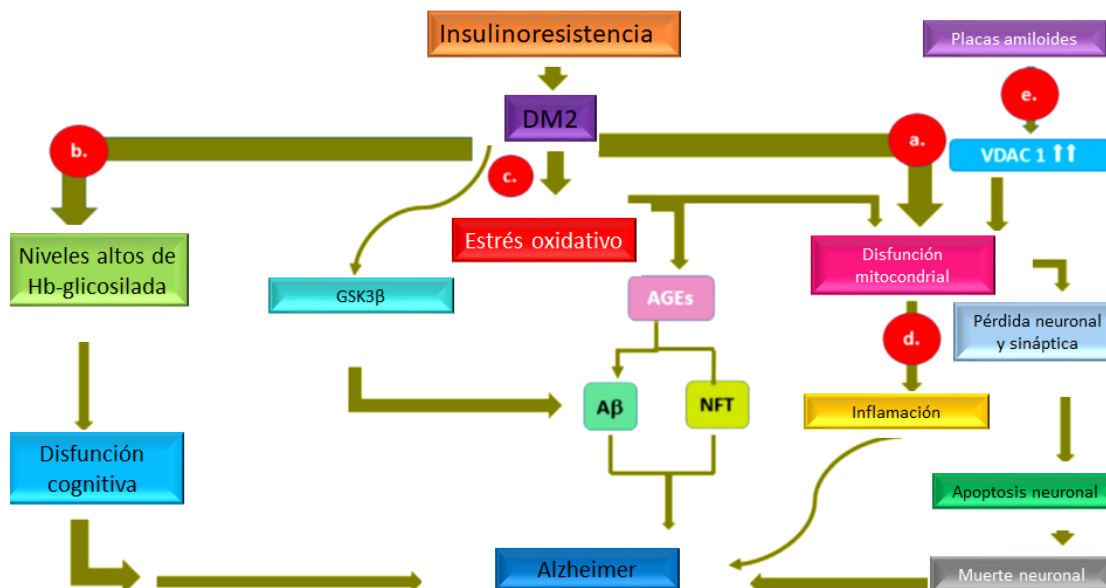


Figura 17. Relación entre DM2 y EA. Modificado de⁷¹

Con base en lo anterior GPR40 resulta un blanco atractivo para el tratamiento de la DM2, ya que su activación tiene múltiples beneficios, por un lado la secreción de insulina por esta vía es dependiente de glucosa eliminando el riesgo de generar hipoglucemia, aunado a esto los agonistas sintéticos de GPR40 tienen la ventaja de no producir apoptosis en las células β -pancreáticas a diferencia de los ligandos endógenos (ácidos grasos), asimismo, los múltiples sitios de unión (ortostérico y alostérico) de GPR40 pueden sinergizar sus efectos y finalmente los agonistas de este receptor podrían mejorar el deterioro cognitivo relacionado a la DM2, e incluso detener el desarrollo de padecimientos como la EA.

2.9.2 Ligandos endógenos y sintéticos de GPR40

GPR40 es sensible a varios ligandos endógenos, tal es el caso del ácido linoleico (LA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), estos agonistas son de tipo total y se unen al sitio ortostérico de este receptor. Asimismo existen agonistas totales de tipo sintético como **AM-1638** y **AM-5262** desarrollados por Amgen.⁷²

Por otro lado se ha reportado una gran variedad de ligandos sintéticos que se unen en un sitio alostérico de este receptor. Uno de los más estudiados es **TAK-875** de laboratorios Takeda que llegó a estudios de fase clínica III; sin embargo en 2013 fue retirado de investigación debido a problemas de hepatotoxicidad, los cuales se asociaron al grupo mesilato y a la alta lipofiliencia de esta molécula. En este sentido se han desarrollado

derivados de ácido fenilpropanoico como **GW9508**, sin embargo mostraron rápida excreción y por lo tanto baja biodisponibilidad oral debido a su susceptibilidad a la β -oxidación. Para evitar este inconveniente, se introdujeron sustituyentes en la posición β del ácido carboxílico surgiendo la molécula **AMG-837**.^{73,74}

De manera adicional, se ha reportado actividad sobre GPR40 de algunos bioisómeros de tipo tiazolindindiona, oxalidindiona, oxadiazolidinona y tetrazol.⁸

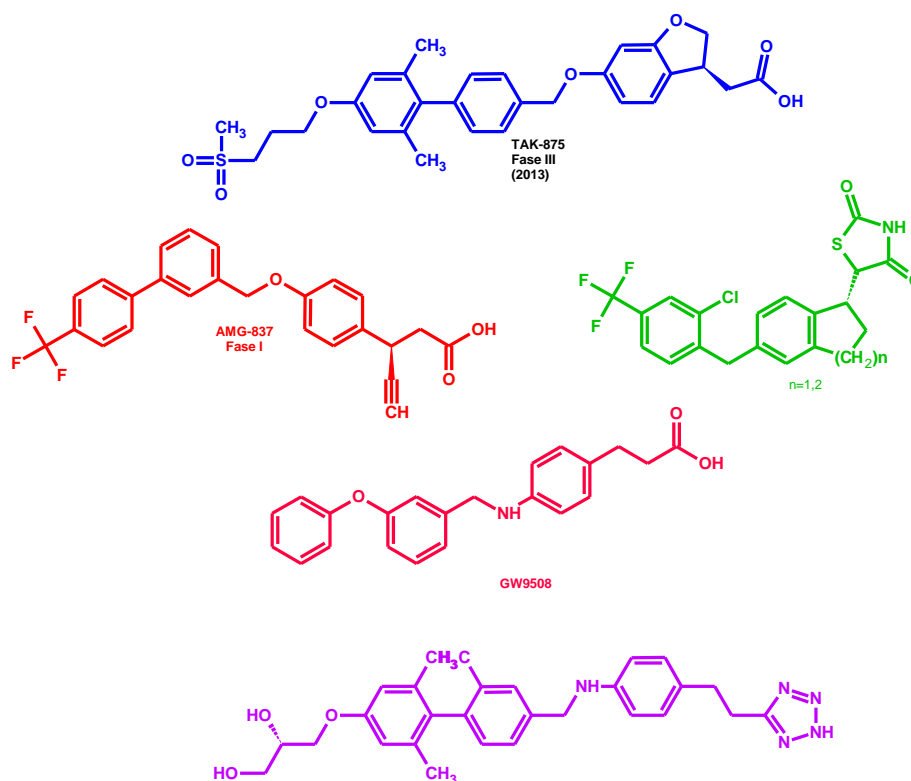


Figura 18. Agonistas GPR40

Es importante señalar que a menudo los fármacos secretagogos de insulina podrían resultar en un agotamiento de las células β -pancreáticas a largo plazo. Por este motivo se ha incluido otro blanco enfocado en la mejora de la sensibilidad a la insulina como PTP1B que complemente las acciones de los agonistas de GPR40.

2.10 Proteínas fosfatasa de tirosina 1B (PTP1B)

Las proteínas fosfatasa de tirosina son una familia de enzimas que catalizan la desfosforilación de tirosina. Entre estas proteínas destaca PTP1B que se expresa en varios tejidos incluyendo músculo esquelético, hígado, tejido adiposo y cerebro, cabe mencionar que se ha observado una sobreexpresión de esta enzima en estados de hiperglucemia. Su

principal función es regular de manera negativa de la señalización de la insulina y leptina. Por lo tanto su inhibición conduce tanto a un incremento en la sensibilidad a la insulina como leptina, lo cual la convierte en un excelente blanco contra obesidad y la diabetes.

2.10.1 Mecanismo molecular de PTP1B

El receptor de insulina es una glucoproteína que consiste en dos subunidades α y dos subunidades intracelulares β , las cuales se encuentran unidas por enlaces disulfuro. Cuando la insulina se une a su receptor (IR), las subunidades α activan las cinasas de tirosina de las subunidades β , autofosforilándose en residuos de Tyr, así mismo estas fosforilan a los sustratos del receptor de insulina IRS1 e IRS2, lo que a su vez promueve la vía Akt y la translocación de GLUT-4. Por su parte PTP1B atenúa la señalización de insulina desfosforilando el IR y el IRS1, de este modo impide que las vesículas que contienen GLUT4 se trasloquen evitando la internalización de glucosa a la célula.⁷⁵⁻⁷⁸

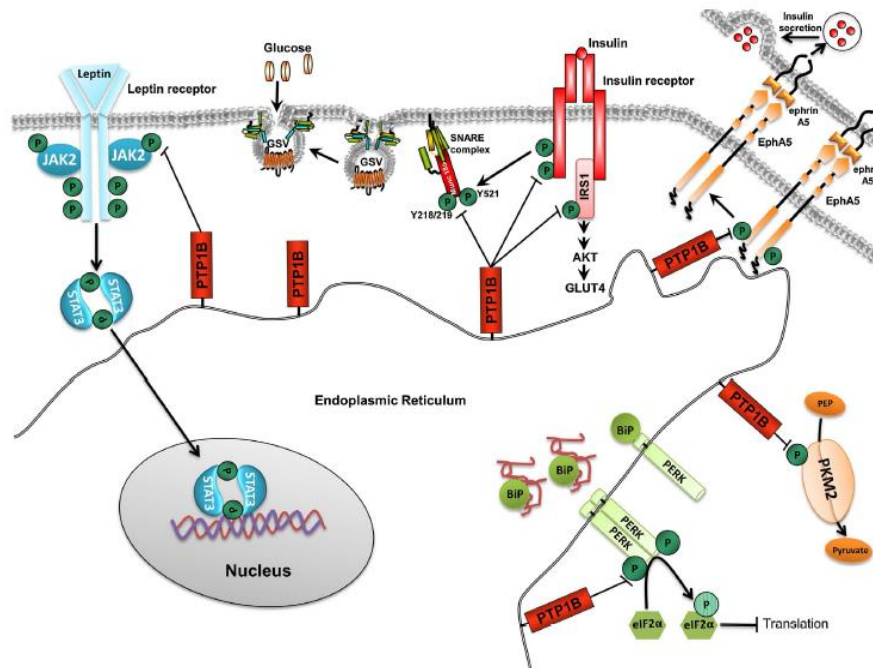


Figura 19. Mecanismo de señalización de PTP1B y leptina.⁷⁵

2.10.2 Mecanismo catalítico PTP1B

El mecanismo catalítico de PTP1B se lleva a cabo a través de la hidrólisis del grupo fosfato de la tirosina, que en su forma ionizada se estabiliza por la formación de puentes de hidrogeno con el loop de unión a fosfato (P-loop) y un residuo de Arginina altamente conservado (Arg 221). Además un dipolo cercano de la α -helice de PTP estabiliza al fosfato.

Una vez que el sustrato se une a la enzima sufre un cambio conformacional que trae como consecuencia que el WPD loop se posicione sobre el pocket de unión a sustrato generando interacciones estabilizantes mismas que son esenciales para la selectividad del sustrato y la actividad catalítica. En el estado cerrado el ácido aspártico (Asp 181) se posiciona cerca del sustrato y forma puentes de hidrógeno con el oxígeno fenólico de la fosfotirosina. Posteriormente el anillo de la fosfotirosina se posiciona para formar interacciones $\pi\pi$, intercalándose entre los residuos hidrofóbicos Tyr 46 y Phe 182. El paso central de la catálisis es el ataque nucleofílico del residuo de cisteína (Cys 215), resultando en la formación de un intermediario covalente fosforotioato. Lo anterior, es posible debido al entorno químico del sitio activo de la fosfatasa, la cisteína (Cys 215) tiene una constante de disociación ácida baja (pKa) (~5.4) este valor de pKa permite a la cisteína actuar como un nucleófilo.⁷⁹ Cabe mencionar que el sitio activo de PTP es de carácter ácido, el anión tiolato es estabilizado por puentes de hidrógeno entre el OH proximal del fragmento Ser/Thr. La geometría del intermediario pentacoordinado es estabilizado por interacciones iónicas entre la Arg 221 cargada positivamente y el carboxilato Asp 181. En un segundo paso el intermediario es atacado por una molécula de agua la cual es desprotonada por Asp 181, promoviendo la liberación de cisteína y la regeneración de la enzima y la disociación del producto. Por otro lado, Ser/Thr se encuentra proximal al residuo conservado de Arg 221 en el loop catalítico y la hidrólisis del aducto enzima-fosfato, posiblemente se da a través de la estabilización por puente de hidrógeno de la carga negativa en el átomo de azufre.⁷

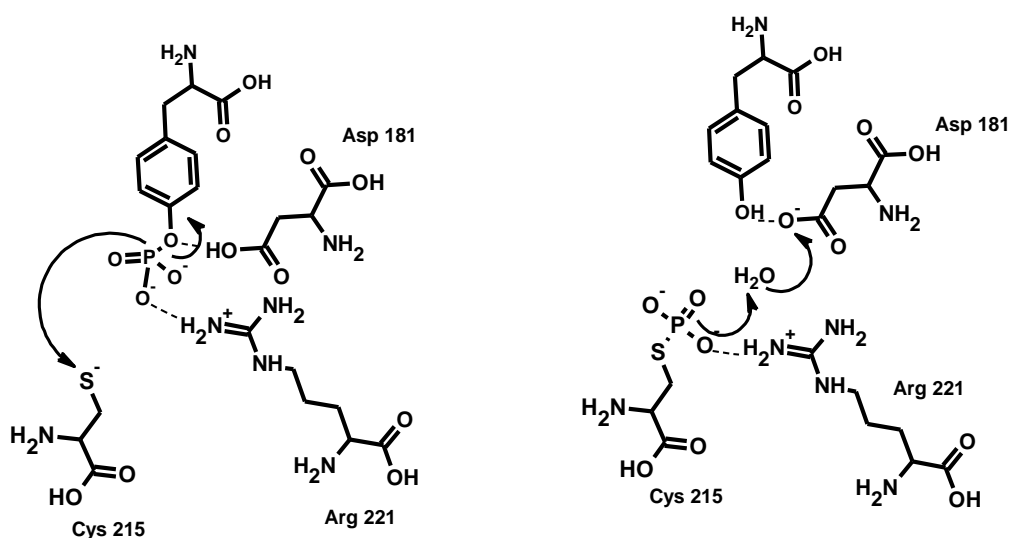


Figura 20. Mecanismo catalítico de la enzima PTP1B

2.10.3 Inhibidores de PTP1B

Se han identificado varios inhibidores de origen natural y sintético de la enzima PTP1B. Algunos de los inhibidores más conocidos son los ácidos pentacíclicos triterpénicos, en especial el ácido ursólico, el cual ha mostrado actividad frente a esta enzima en ensayos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.⁸⁰

Otros inhibidores interesantes son algunos derivados de ácidos carboxílicos con heterocíclicos en su estructura, ya que han mostrado buena actividad frente a PTP1B, además de buena permeabilidad celular y biodisponibilidad oral.^{81, 9}

Por otro lado, el grupo de investigación de Maccari *et al* ha desarrollado una gran variedad de compuestos de tipo ácido 4-(5-ariliden-2,4-dioxotiazolidin-3-il)metilbenzoico, ácido 4-[(5-ariliden-4-oxo-2-feniliminotiazolidin-3-il)metil]-benzoico y ácido 4-[[5-(4-benziloxibenciliden)-2-(4-trifluorometilfenilimino)-4-oxo-3-tiazolidinil]metil]benzoico, los cuales han mostrado una excelente actividad inhibitoria sobre la enzima PTP1B humana.⁹⁻

12

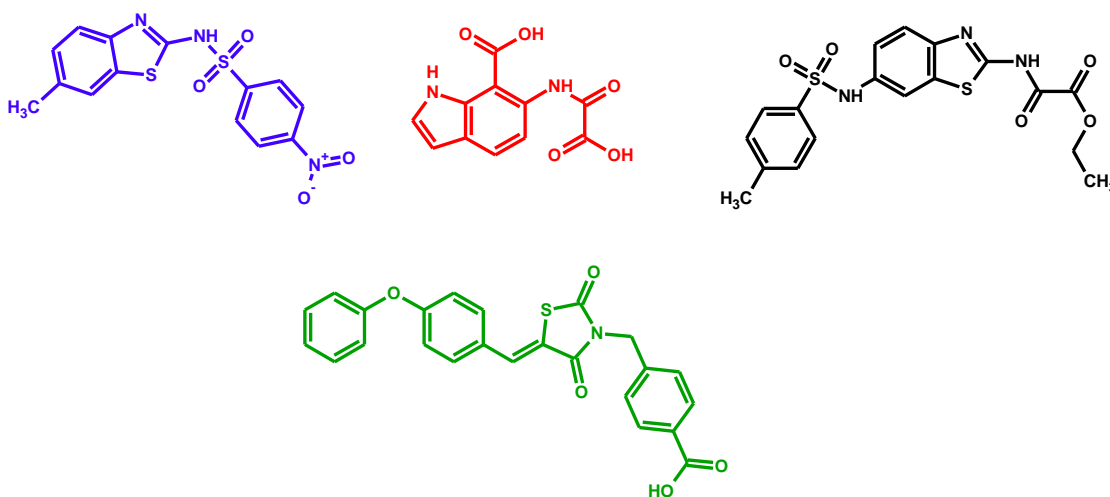


Figura 21. Inhibidores de PTP1B

Con base en lo anterior el fragmento de tiazolidindiona y sus bioisómeros representan un excelente scaffold para el desarrollo de compuesto líderes frente a este blanco.

Otro de los blancos que se tomó en cuenta para este proyecto es la enzima aldosa reductasa, ya que ha sido ampliamente descrito que está asociada con la patogénesis de las complicaciones de la diabetes mellitus.

2.11 Aldosa reductasa (AR)

Es una aldo-ceto reductasa que se encuentra en el citoplasma celular y se expresa en tejidos en los que la captación de glucosa es independiente de insulina. Su función en condiciones normales es la degradación de aldehídos tóxicos provenientes de la peroxidación de lípidos como el 4-hidroxi-trans-2-nonenal (HNE) y su producto conjugado con glutatión (GS-HNE). En estas condiciones la reducción de glucosa a sorbitol es únicamente alrededor del 3%. En la DM2 la enzima aldosa reductasa se encuentra sobreexpresada, la hiperglucemia causa un aumento en el metabolismo de glucosa a través de la vía de los polioles catalizando la conversión de glucosa a sorbitol dependiente de NADPH. Posteriormente este es oxidado a fructosa por la sorbitol deshidrogenasa con la consecuente reducción de NAD^+ . Lo anterior ocurre una vez que la hexoquinasa se ha saturado en tejidos que poseen captación de glucosa independiente de insulina como: lentes oculares, retina, nervios periféricos, riñones y eritrocitos provocando estrés osmótico y modificaciones en el estado redox en dichos tejidos.⁸²

2.11.1 Mecanismo catalítico AR

El mecanismo de reducción de los carbonilos se lleva a cabo a través del ataque de uno de los hidruros de NADPH al carbonilo del sustrato, posteriormente el oxígeno del sustrato abstrae un protón del fenol de la Tyr 48. El resultado es el fenóxido de la tirosina, el cual es estabilizado mediante una interacción iónica con Lys 77.⁸³

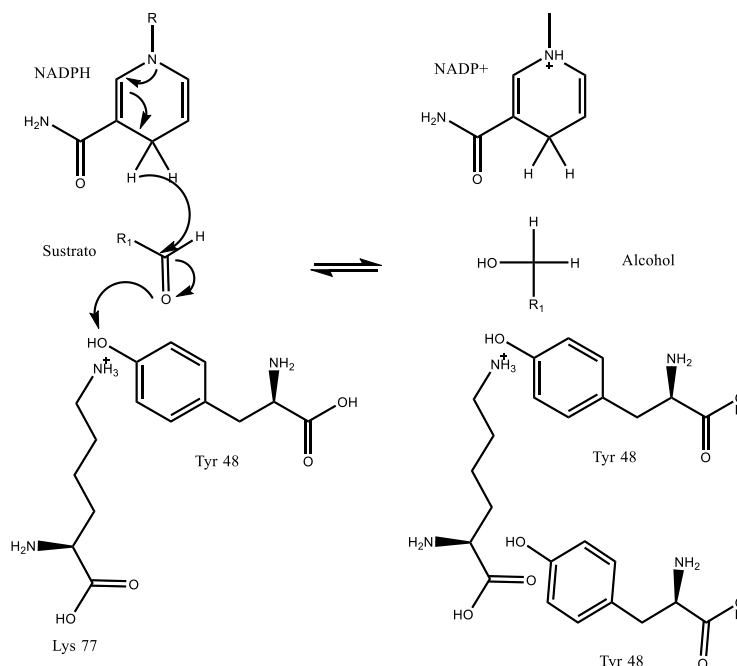


Figura 22. Mecanismo catalítico de la reducción de carbonilos a alcoholes por AR

2.11.2 Mecanismo molecular AR

Asimismo el aumento de la vía de los polioles causa un decremento del NADPH, de este modo las enzimas que lo utilizan para su acción se ven afectadas. Tal es el caso de la glutatión reductasa que se encarga del metabolismo de especies reactivas de oxígeno (ROS), esta alteración de la relación $\text{NADH}/\text{NAD}^{+13}$ es conocida como pseudohipoxia.¹³

Por otro lado, la formación de productos de glicación avanzada (AGEs) se ve aumentada, causando alteraciones en la función de algunas proteínas. La fructosa juega un papel importante en este proceso, ya que es más reactiva que la glucosa y es capaz de reaccionar con los grupos amino de las proteínas para formar bases de Schiff¹³ y productos de amadori, mismos que dan origen a más AGEs. De igual modo la fructosa puede generar compuestos carbonílicos electrofílicos como la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), gliceraldehído 3-fosfato y metilglioxal que a su vez causan la formación de AGEs. Posteriormente DHAP puede ser reducido a glicerol-3-fosfato precursor de diacilglicerol (DAG) que a su vez activa a la proteína quinasa C (PKC) promoviendo la producción de ROS.

Cabe mencionar que se ha observado un aumento de la peroxidación lipídica inducida por ROS, dando origen a aldehído tóxicos como HNE el cual causa un incremento de la expresión de AR actuando como segundo mensajero. El mecanismo de acción de esta molécula es el ataque electrofílico a aminas de proteínas produciendo daño celular.

HNE y su conjugado con glutatión GS-HNE es convertido por AR a 2-nonene-1,4-diol (DHN) y GS-DHN, respectivamente, este último es un potente mediador de estrés oxidativo que induce la activación de la fosfolipasa C (PLC)/DAG/PKC y el factor de transcripción nuclear κB (NF- κB). La activación de este es un paso clave en la respuesta inflamatoria ya que regula la transcripción de numerosos genes inflamatorios, apoptóticos, de proliferación celular y adhesión que determinan la expresión de citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento, factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Todos estos promueven la apoptosis del tejido endotelial, hiperplasia vascular, infiltración, adhesión de células proinflamatorias a las paredes vasculares, que están relacionadas con ateromas, nefropatía diabética e isquemia al miocardio. Más adelante la producción de IL-6 IL-1 β y TNF- α promueven la activación de NF- κB que media los procesos inflamatorios seguido de apoptosis en las células β -pancreáticas y disminución de la secreción de insulina (Figura 23).

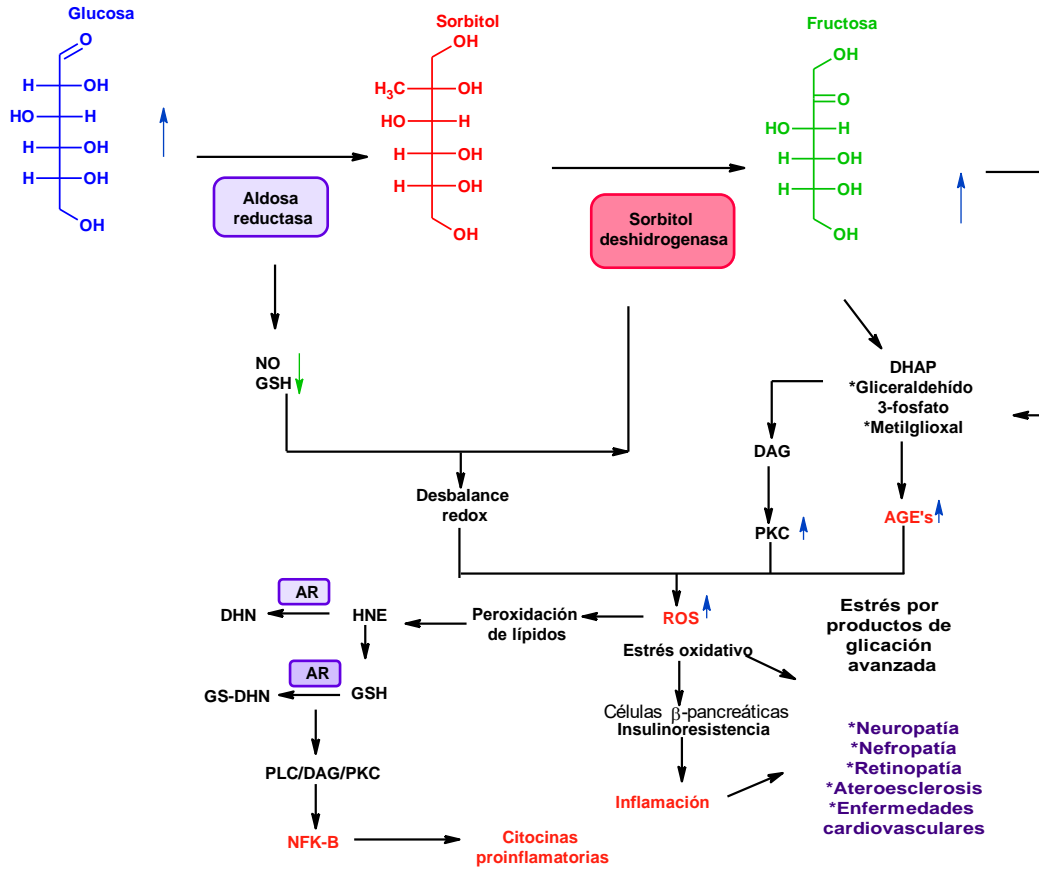


Figura 23. Vía de señalización de aldosa reductasa

2.11. 3 Inhibidores AR

Se han estudiado una gran variedad de inhibidores de la enzima aldosa reductasa (ARIs); sin embargo su desarrollo ha sido complicado debido a problemas de farmacocinética, poca eficacia *in vivo*, así como efectos adversos.

Los primeros ARIs fueron de tipo flavonoide, posteriormente se desarrollaron moléculas de tipo 2-tioxo-1,3-tiazolidin-4-ona N-sutituidos como el Epalrestat^{86, 13}, el cual es el único fármaco (ARIs) aprobado y comercializado para el tratamiento de la neuropatía diabética; no obstante su uso se limita a algunos países como Japón e India.¹⁵

La investigación de Sorbinil un conocido inhibidor de AR fue abandonada durante las pruebas clínicas debido a reacciones de hipersensibilidad relacionadas al fragmento de hidantoína, con base en lo anterior se han desarrollado bioisómeros de tipo tiazolidindiona y ácidos carboxílicos.^{16, 17, 87}

Tolrestat un derivado de tipo ácido carboxílico fue lanzado al mercado en 1989 y retirado en 1996 debido a hepatotoxicidad y poca eficacia *in vivo*.¹³ Zopolrestat y Zenarestat también fueron retirados de pruebas clínicas debido a hepatotoxicidad y toxicidad renal. Por otro

lado, Fidarestat mostró mejor eficacia y selectividad que Sorbinil, además mostró efectos clínicos notables en el tratamiento de la neuropatía diabética.

Por otro lado compuestos de tipo espirosuccinimidas como Minalrestat y Ranirestat; así como compuestos de tipo ácido carboxílico han manifestado buena actividad frente a esta enzima y buenos perfiles clínicos.

Es importante destacar que los ARIs también han mostrado que previenen eventos inflamatorios. Estos hallazgos sugieren que estas moléculas pueden ser usadas no solo en el tratamiento de la DM2 y sus complicaciones, sino en otras enfermedades como artritis reumatoide, sepsis, aterosclerosis y cáncer.⁸

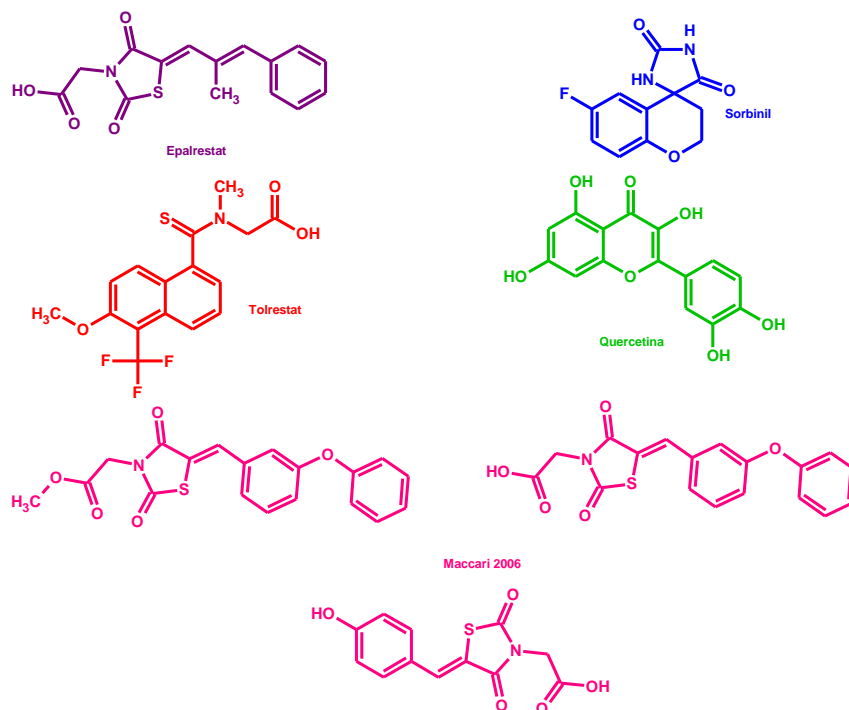


Figura 24. Inhibidores de la enzima aldosa reductasa

3. JUSTIFICACIÓN

La diabetes es una enfermedad con una alta prevalencia a nivel mundial; en México se encuentra entre las 10 principales causas de muerte. Además está asociada a múltiples complicaciones, por lo que requiere el uso de distintos tipos de fármacos (polifarmacia), así como un tratamiento de por vida. La polifarmacia utilizada actualmente trae como consecuencia una gran cantidad de efectos adversos y no ofrece un tratamiento integral. Es por esto que es de suma importancia el desarrollo de nuevos compuestos contra esta enfermedad.

Este proyecto químico-farmacéutico pretende aportar compuestos bioactivos que actúen sobre distintos blancos terapéuticos relacionados con la DM2 de forma simultánea (polifarmacología).

4. HIPÓTESIS

Las benciliden-1,3-tiazolidin-2,4-dionas y los derivados del ácido fenilpropanoico poseerán acción antidiabética debido a su efecto simultáneo sobre PPAR, GPR40, PTP1B y aldosa reductasa.

4.1 Objetivo general

Diseñar, sintetizar y determinar la actividad antidiabética *in vitro*, *in vivo* e *in silico* (*in combo*) de las benciliden-1,3-tiazolidin-2,4-dionas y los derivados del ácido fenilpropanoico.

4.2 Objetivos específicos

- Diseñar, sintetizar y caracterizar las benciliden-1,3-tiazolidindin-2,4-dionas (serie A) y derivados del ácido fenilpropanoico (serie B).
- Evaluar *in silico* el espectro de actividad biológica y algunos parámetros ADMET en múltiples blancos implicados en el proceso de la diabetes; asimismo jerarquizar mediante análisis de consenso farmacológico los compuestos a evaluar *in vitro* e *in vivo*.
- Determinar la actividad agonista *in vitro* de los compuestos sintetizados sobre PPAR- α y PPAR- γ .

- Analizar e interpretar la relación estructura-actividad *in vitro* de los compuestos sintetizados sobre las enzimas PTP1B y aldosa reductasa, así como el receptor GPR-40.
- Determinar la eficacia *in vivo* de los compuestos que resulten más activos en los ensayos *in vitro*, en un modelo murino de diabetes mellitus no insulino dependiente.
- Llevar a cabo el acoplamiento molecular refinado sobre PPAR, GPR40, PTP1B y aldosa reductasa de los compuestos que resulten más activos.

5. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO MOLECULAR

Para el diseño de los compuestos **ACB-1-10** se tomó como base el farmacóforo y los ligandos endógenos de los agonistas duales PPAR- α/γ y GPR40 (Figura 26).^{7, 68}

Los ligandos endógenos de PPAR- α/γ y GPR40 son ácidos grasos de cadena larga a media como el ácido decanoico, ácido linoleico y ácido docosahexaenoico (DHA). En la Figura 25 se muestra el alineamiento molecular con el ácido docosahexaenoico (A) y el compuesto **ACB-7**. En donde se observa que ambos adoptan la misma conformación espacial en la región hidrofóbica, el anillo aromático central, así como la región ácida.

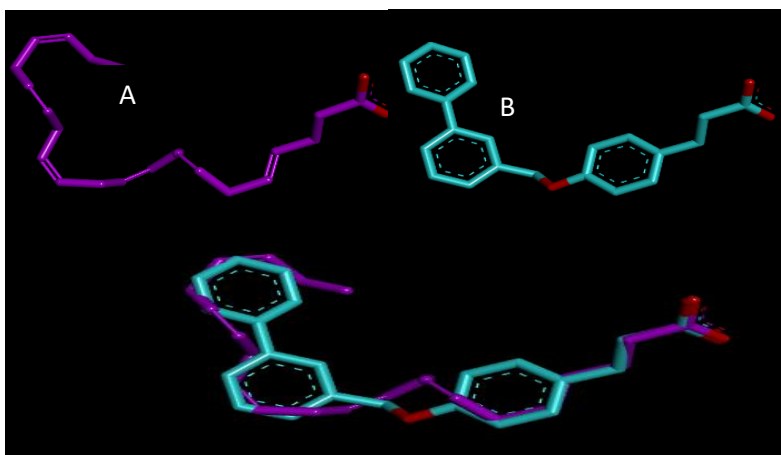


Figura 25. Alineamiento molecular de las moléculas DHA (morado), **TUG-891** y **ACB-7** (cian).

En la Figura 26 se muestra el patrón farmacofórico de los agonistas sintéticos de PPAR- α/γ y GPR40.

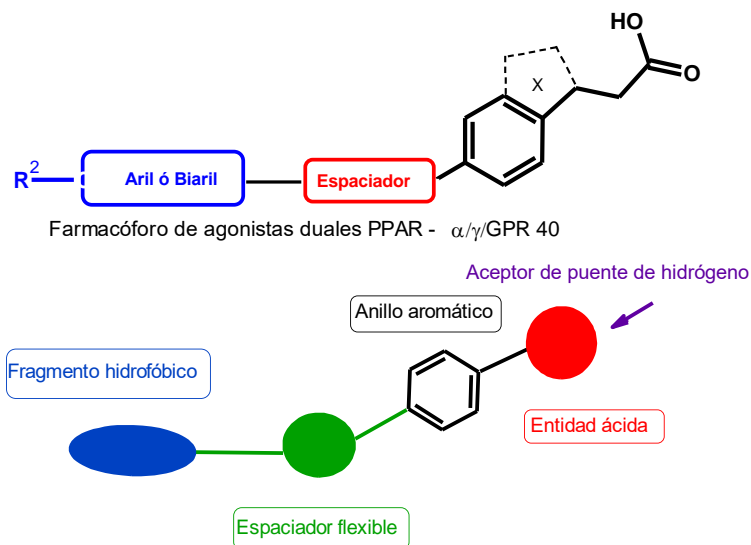


Figura 26. Farmacóforo de agonistas duales y GPR40.

El farmacóforo de los agonistas duales PPAR- α/γ /GPR40 está conformado por las siguientes regiones:

- ✓ Una región con un grupo ionizable negativo correspondiente al ácido carboxílico de la molécula, mismo que está presente en los ligando naturales (ácidos grasos).
- ✓ Un anillo aromático unido a la región acida.
- ✓ Un espaciador semi-rígido
- ✓ Un fragmento hidrofóbico, que le permita interactuar mediante fuerzas no polares con el sitio auxofórico del receptor.
- ✓ Un aceptor de puente de hidrógeno.

Por otro lado los inhibidores de aldosa reductasa poseen dos elementos farmacofóricos principales.⁸⁸

- a) Un fragmento ácido (ácido carboxílico o bioisósteros) el cual interactúa con la subcavidad rígida del sitio activo de aldosa reductasa llamada sitio de unión a anión. En esta subcavidad también está presente la coenzima NADPH.
- b) Una porción lipofílica que interactúe con la subcavidad flexible del sitio activo de la enzima aldosa reductasa.

En la Figura 27 se muestra al inhibidor **IDD-740**, en la que se observa los requerimientos estereoelectrónicos de su farmacóforo. Además se encontró una región extra correspondiente a un anillo aromático central. Con base en lo anterior se planteó un farmacóforo unificado para estas dianas.

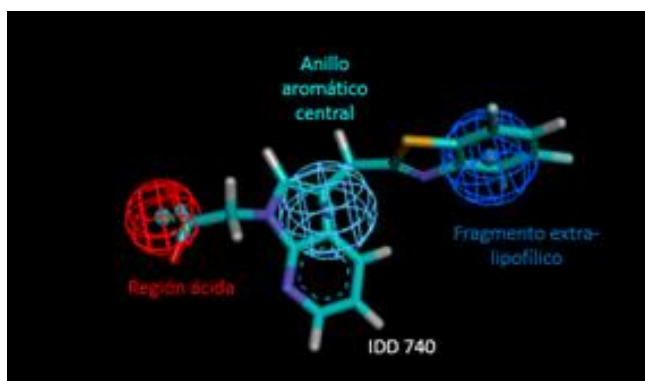


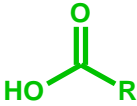
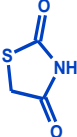
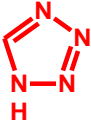
Figura 27. Requerimientos farmacofóricos de los inhibidores de aldosa reductasa.

Uno de los fragmentos al cual se le han realizado diversas modificaciones es a la entidad ácida. Dado esto, se ha encontrado en la literatura que la presencia de grupos ácidos más

polares que la tiazolidindiona (bioisómeros) favorece la actividad antidiabética, razón por la cual en este trabajo se abordarán los bioisómeros de tipo ácido carboxílico.⁸⁹ En la Tabla 1 se muestran las características fisicoquímicas de los bioisómeros de tiazolidindiona, en donde se observa que tanto la tiazolidindiona como el ácido carboxílico muestran valores similares de pKa, tPSA y logπ con excepción del volumen estérico; sin embargo, esto podría favorecer la afinidad de los compuestos hacia los blancos planteados.⁹⁰

Cabe mencionar que los ácidos carboxílicos constituyen un importante farmacóforo en diversos fármacos antidiabéticos.

Tabla 1. Características de los bioisómeros de la tiazolidindiona.

Bioisómeros		
 <p>Ácido carboxílico</p>	 <p>Tiazolidindiona</p>	 <p>Tetrazol</p>
pKa~4.5	pKa~5.0-6.5	pKa~4.5
tPSA=37.3	tPSA=46.16	tPSA=49.11/54
logπ=-0.51	logπ=-0.55	logπ=-0.60
Vol= 39.6	Vol= 87	Vol= 56.5

En el diseño de las benciliden-1,3-tiazolidin-2,4-dionas (serie A) y derivados del ácido fenilpropanoico (serie B) se tomó como referencia una molécula generada por nuestro grupo de trabajo **SHF-1**, la cual conserva el farmacóforo de los agonistas duales y GPR40. Cabe mencionar que el compuesto **SHF-1** ha mostrado tener actividad antihiper glucemiante en un ensayo *in vivo* y actividad sobre los receptores PPAR α/γ en ensayos *in vitro*. Por otro lado en un estudio de acoplamiento molecular mostró interacciones con GPR40.^{91, 92}

Adicionalmente, para la **serie A** se tomó en cuenta la Pioglitazona (agonista PPAR- γ) fármaco de primera elección entre las glitazonas; ya que el uso de Rosiglitazona se ha limitado debido a efectos cardiotoxicos. De esta manera se conservó el núcleo de tiazolidindiona. Por otro lado, para la **serie B** se tomó como referencia a la molécula **TUG-891** que es un derivado del ácido fenilpropanoico. Este compuesto manifestó una gran afinidad sobre los receptores GPR120 y GPR40 que están implicado en la homeostasis

metabólica (Figura 28).⁹³ Además se tomaron en cuenta a Zopolrestat un conocido inhibidor de la enzima aldosa reductasa, el cual contiene un ácido de tipo fenilpropanoico en su estructura⁹⁴ y a la molécula **GW9508** que mostró una actividad importante sobre GPR40.⁹⁵ Debido a que todos los compuestos que se tomaron como referencia (Pioglitazona, **SHF-1**, **TUG-891**, **GW9508** y Zopolrestat) presentan un patrón farmacofórico similar (farmacóforo unificado) se espera que los compuestos diseñados **ACB-1-10** manifiesten actividad sobre PPAR- γ , GPR40, AR y PTP1B.

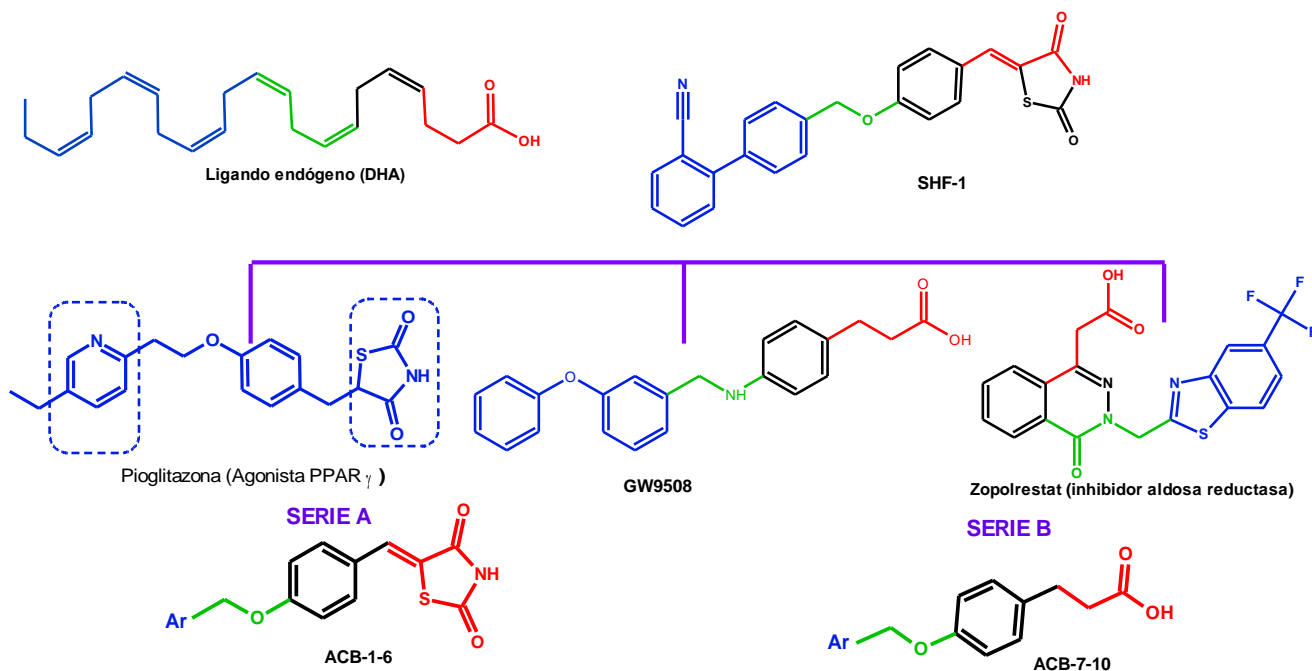


Figura 28. Fármacos de referencia para el diseño de los compuestos **ACB-1-10**.

De manera particular para el diseño de las benciliden-1,3-tiazolidin-2,4-dionas (serie A) se conservó el fragmento de la tiazolidindiona unido por un doble enlace al anillo aromático de la molécula. Además, se llevaron a cabo diversas modificaciones en el fragmento lipofílico utilizando diversos núcleos. Para el compuesto **ACB-1** se tomó el fragmento del bifenilo del compuesto **SHF-1** cambiando el enlace con el espaciador flexible de posición cuatro a posición tres, así mismo se llevó a cabo la remoción del sustituyente CN de la posición dos. Para los compuestos **ACB-4-6** se conservó el núcleo de piridina de la Pioglitazona y se adicionaron diversos sustituyentes electrodonadores en las posiciones 3, 4 y 5. Por otro lado, se introdujo el núcleo quinolina que es el benzólogo de piridina para el compuesto **ACB-3**. Finalmente para el compuesto **ACB-2** se utilizó en núcleo de naftaleno un bioisómero de quinolina.

Para el caso de los derivados del ácido fenilpropanoico también se llevaron a cabo modificaciones moleculares en el fragmento lipofílico. Para el compuesto **ACB-7** se conservó el núcleo de bifenilo de **TUG-891**, al cual se le llevó a cabo un cambio de posición a su enlace con el espaciador flexible de posición dos a tres, así mismo se removieron los sustituyentes del anillo. Para la molécula **ACB-9** se tomó la porción lipofílica **SHF-1**. Por otro lado, para los compuestos **ACB-8** y **ACB-10** se utilizaron núcleos tales como el naftaleno y quinolina respectivamente; los cuales son estructuras privilegiadas (Figura 29).

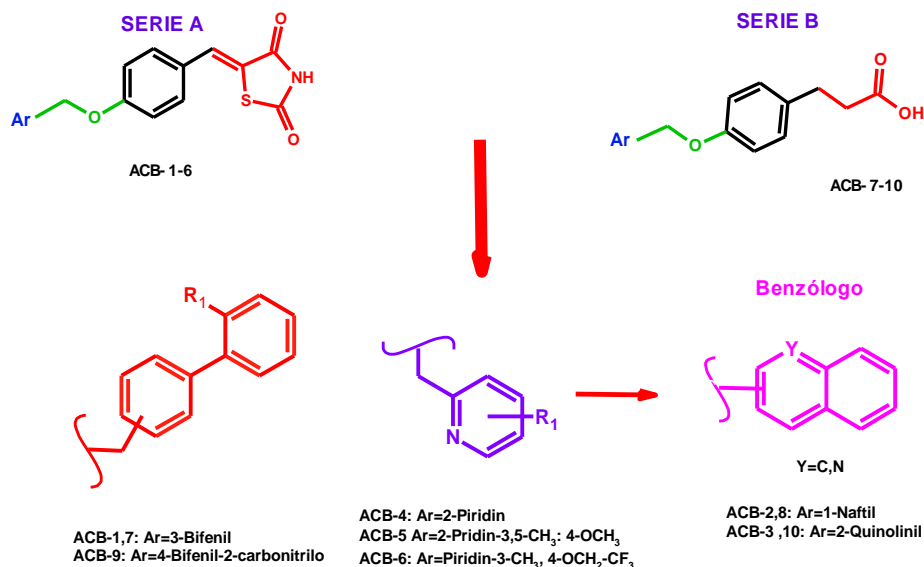


Figura 29. Diseño y modificaciones estructurales de los compuestos **ACB-1-10**.

5.1 FARMACÓFOROS

5.1.2 Farmacóforo de la serie A

En la Figura 30 se observa que el farmacóforo del compuesto **SHF-1** y el de **ACB-1** está conformado por las mismas regiones que el de los agonistas PPAR- α/γ /GPR40.

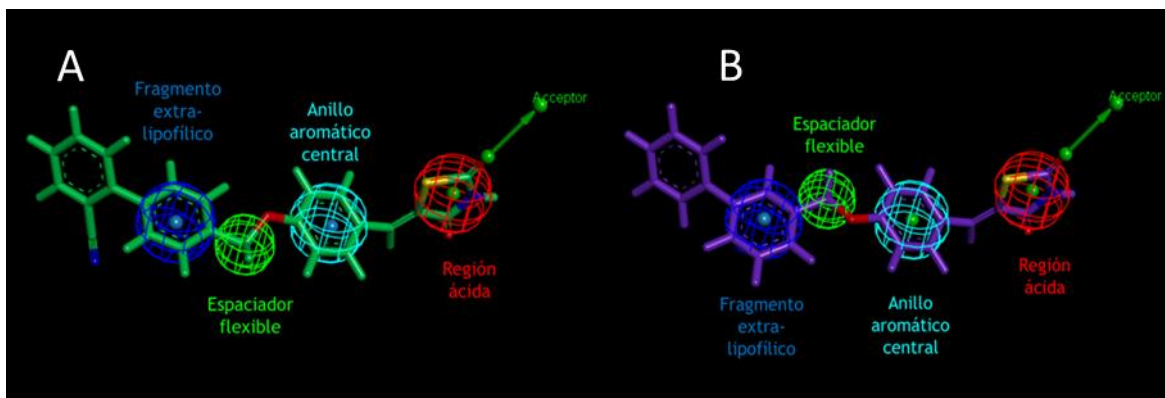


Figura 30. Farmacóforo de **SHF-1** (A) Y **ACB-1** (B).

En la Figura 31 se observa el alineamiento molecular de **SHF-1** molécula de referencia y **ACB-1** compuesto diseñado en la que se muestra que ambos compuestos conservan los requerimientos estereoelectrónicos del farmacóforo planteado.

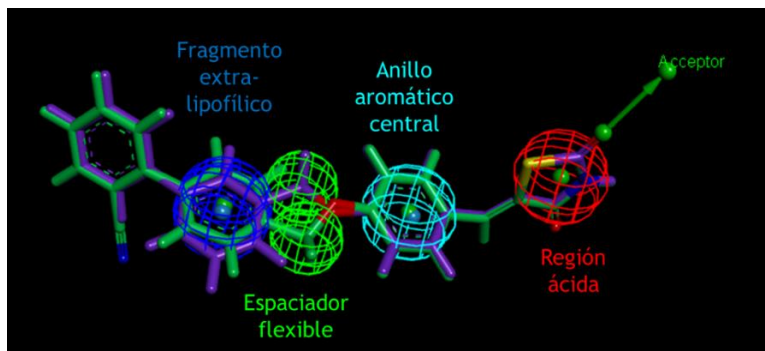


Figura 31. Alineamiento molecular del farmacóforo de *SHF-1* (verde) con el del compuesto diseñado *ACB-1* (morado).

5.1.3 Farmacóforo de la serie B

En la Figura 32 se muestran los farmacóforos construidos para los derivados del ácido fenilpropanoico (serie B).

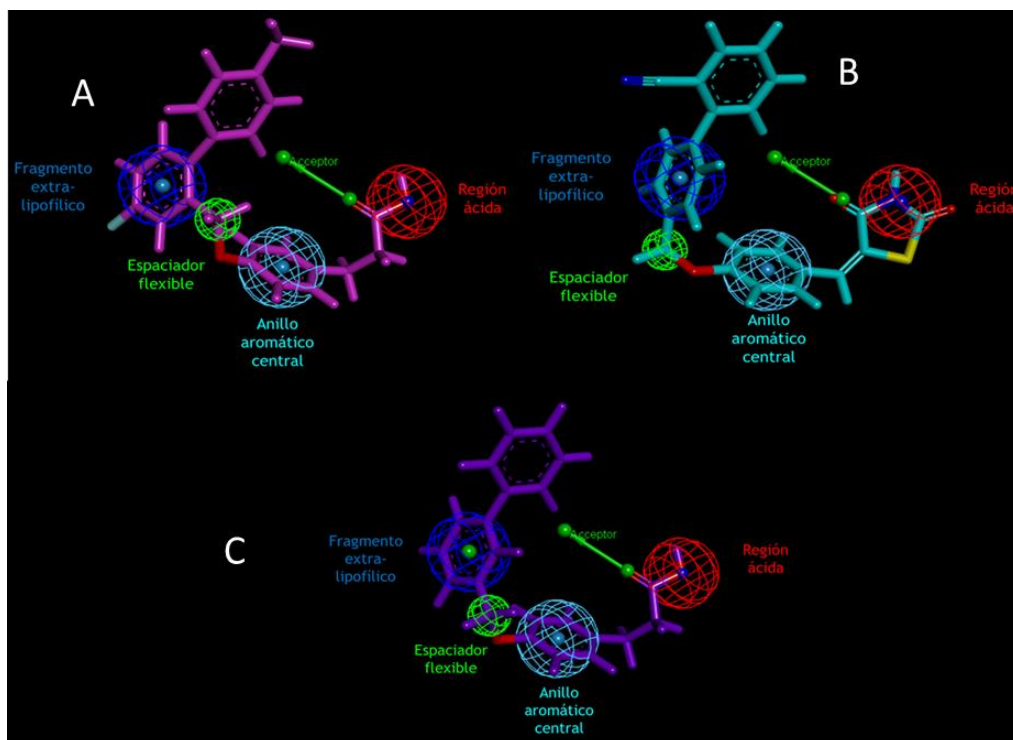


Figura 32. Farmacóforos de *TUG-891* (A), *SHF-1* (B) y *ACB-7* (C).

De este modo se muestra que los compuestos diseñados para esta serie conservan el patrón farmacofórico de los agonistas PPAR- α/γ /GPR40. Adicionalmente se observó que **TUG-891** presenta una similitud en cuanto a sus requerimientos estructurales, ya que el

farmacóforo construido contiene un fragmento ácido seguido de un anillo aromático central asociado a un fragmento lipofílico mediante un espaciador flexible (Figura 33).

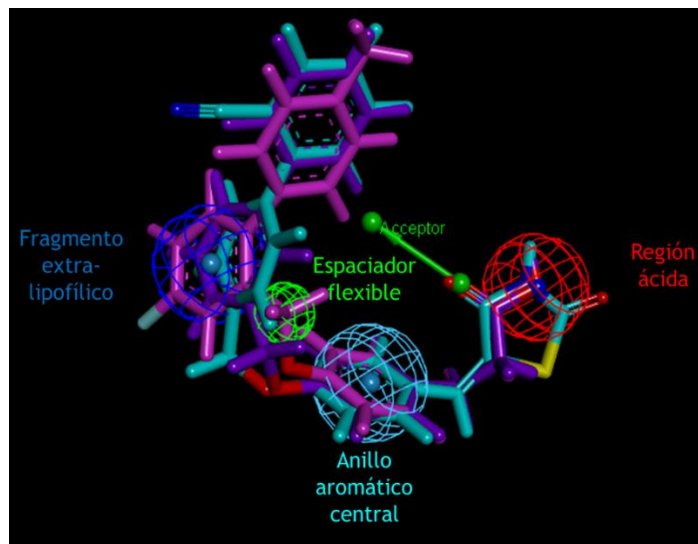
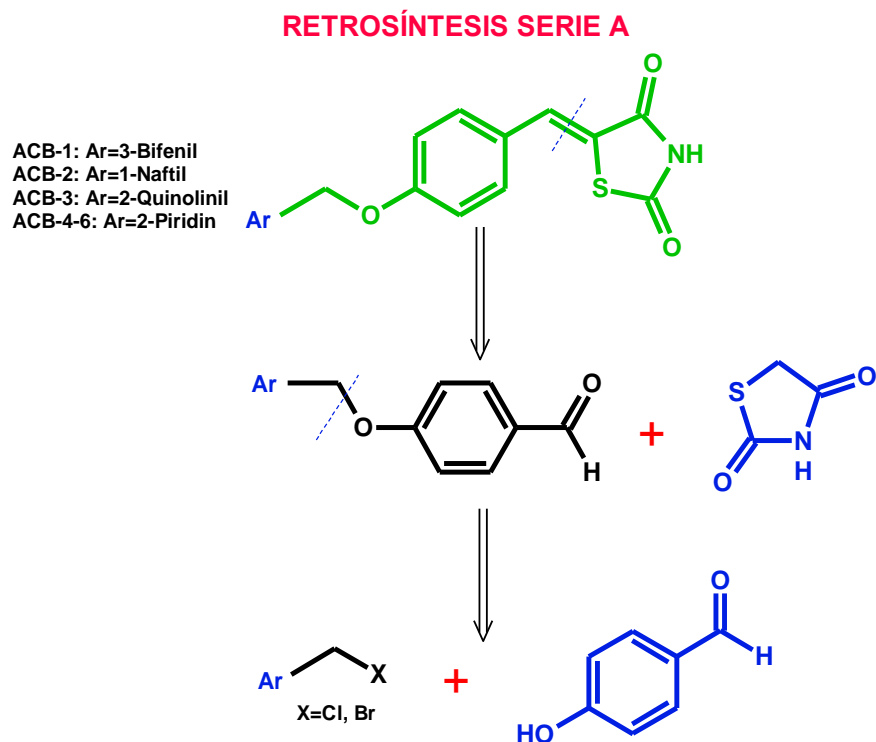


Figura 33. Alineamiento molecular de las moléculas **SHF-1** (azul), **TUG-891** (rosa) y **ACB-7** (morado).

6. RETROSÍNTESIS

El análisis retrosintético nos indica cual es la ruta de síntesis más apropiada a partir de materias primas accesibles.

Para los compuestos **ACB1-6** se planteó un esquema de restrosíntesis lineal (Esquema 1).

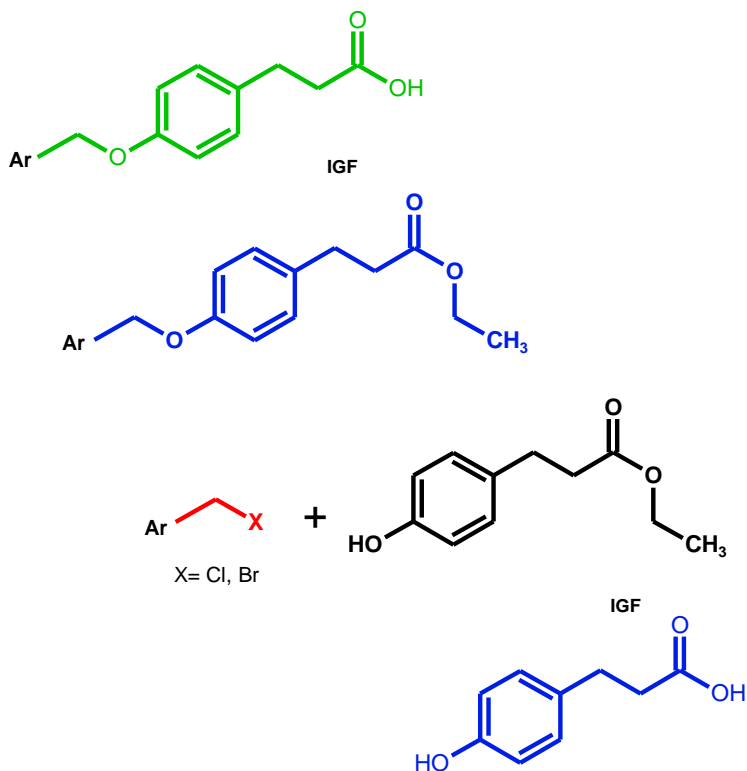


Esquema 1. Retrosíntesis lineal propuesta para la obtención de los compuestos **ACB-1-6**

La primera desconexión se realizó en el enlace de bencilideno, entre el metino y el heterociclo de tiazolidin-2,4-diona, obteniendo los compuestos (aril-metiloxi)benzaldehídos correspondientes. Estos a su vez se desconectaron en el enlace carbono-oxígeno del éter para generar los halogenuros de metil-arilo adecuadamente sustituidos y el 4-hidroxibenzaldehído.

RETROSÍNTESIS SERIE B

ACB-7: Ar=3-Bifenil
ACB-8: Ar=1-Naftil
ACB-9: Ar=4-Bifenil-2-carbonitrilo
ACB-10: Ar=2-Quinolil



Esquema 2. Retrosíntesis lineal propuesta para la obtención de los compuestos **ACB-7-10**

Para los derivados del ácido fenilpropanoico se llevó a cabo un intercambio de grupo funcional (IGF) del éster a ácido carboxílico. Posteriormente se llevó a cabo una desconexión en el enlace carbono-oxígeno del éter generando los halogenuros de metil- arilo correspondientes y el propanoato de 3-(4-hidroxifenil) etilo; al cual se le realizó un intercambio de grupo funcional generando el ácido 3-(4-hidroxifenil)propanoico que es comercialmente disponible.

6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Las metodologías empleadas para el desarrollo de este trabajo de tesis se dividieron en tres partes:

Parte química

Esta parte indica la metodología empleada para el diseño y la síntesis de los compuestos, que se llevó a cabo en el Laboratorio 5 de la Facultad de Farmacia UAEM bajo la dirección del Dr. J. Gabriel Navarrete Vázquez.

La obtención de espectros de RMN (^1H , ^{13}C , 2D) y los espectros de masas (IE) fueron facilitados por el Dr. Emanuel Hernández del departamento de Recursos del Mar CINVESTAV. La interpretación de los resultados se realizó en el Laboratorio 5 de la Facultad de Farmacia UAEM.

Parte *in silico*

La parte computacional consta de la predicción del espectro de actividad (PASS), la predicción de algunos parámetros toxicológicos (ACD/Tox. Suite) y Docking inverso a través del servidor web DIA-DB en el Laboratorio 5 de la Facultad de Farmacia, UAEM.

El acoplamiento molecular se llevó a cabo en el Laboratorio 5 de la Facultad de Farmacia, UAEM, bajo la asesoría del M.F. Abraham Alberto Gutiérrez Hernández.

Parte farmacológica

In vitro

Comprende las metodologías empleadas para la evaluación *in vitro* sobre la expresión de receptores PPAR- α , PPAR- γ y sus productos de activación: GLUT-4 y FATP-1. Estas evaluaciones se llevaron a cabo mediante una estancia de investigación bajo la dirección del Dr. Julio C. Almanza Pérez Laboratorio de Farmacología, Depto. Ciencias de la Salud, (UAM Iztapalapa) y bajo la asesoría del M.B.E. Abraham Giacomán Martínez.

La evaluación *in vitro* del efecto de inhibición sobre la enzima PTP1B se realizó en colaboración con el Dr. Paolo Paoli del Departamento de Ciencias Bioquímicas de la Universidad de Florencia, Italia.

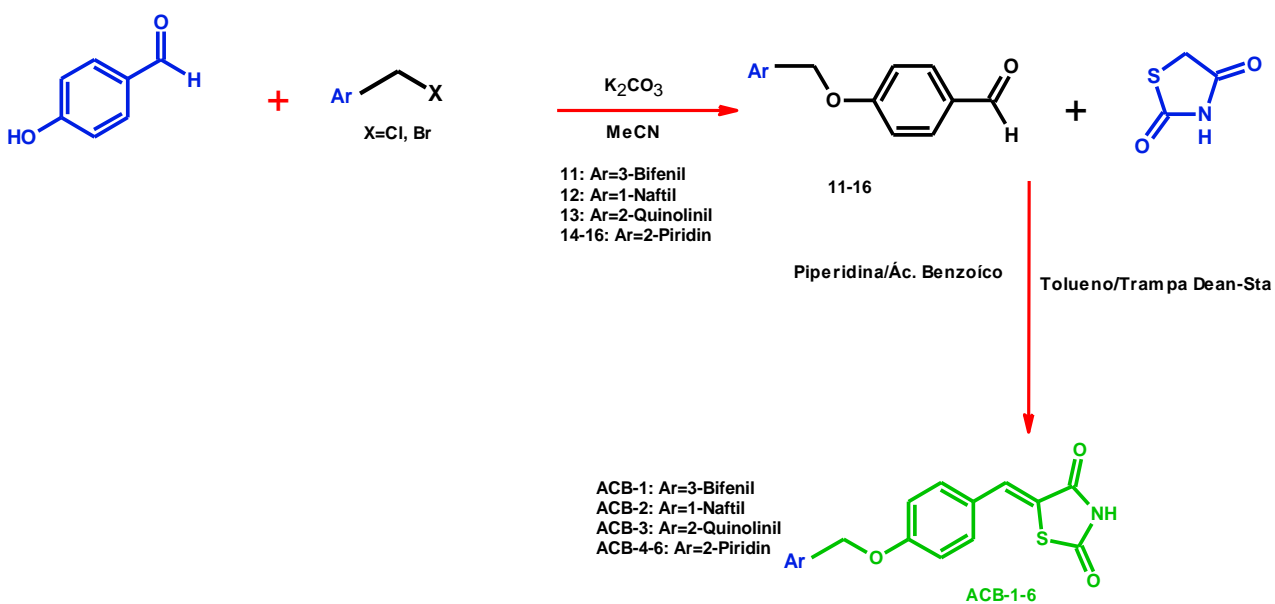
La evaluación *in vitro* del efecto de inhibición sobre la enzima aldosa reductasa se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Umberto Mura de la Universidad de Pisa, Italia.

In vivo

La determinación de efecto antidiabético fue llevada a cabo con la colaboración del Dr. Samuel E. Estrada Soto del Laboratorio 12 de la Facultad de Farmacia UAEM bajo la asesoría de la M.F Litzia Cristel Cerón y la M.F Fabiola Chávez Silva.

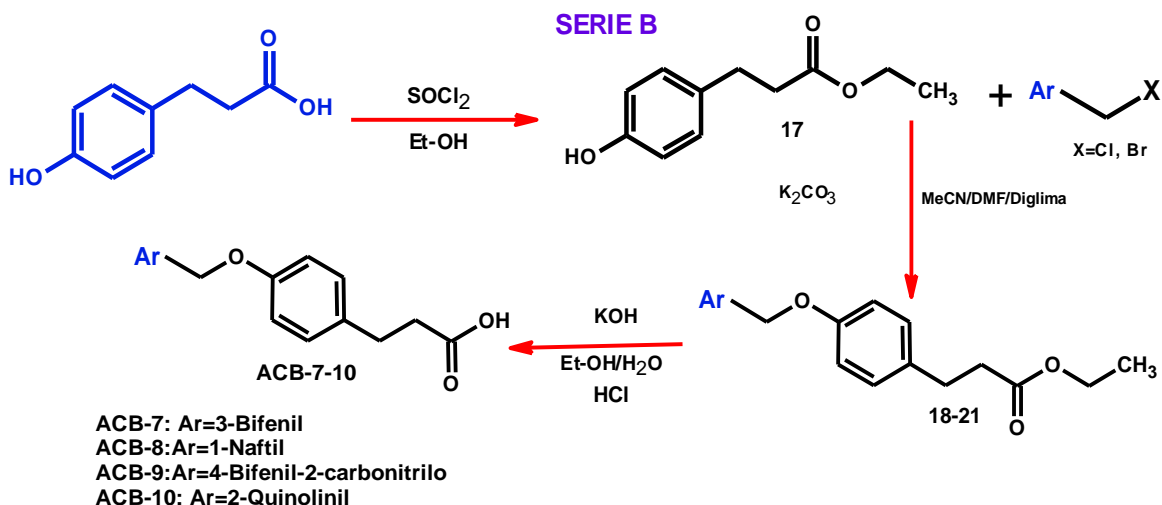
6.1 Parte química

Para la síntesis de las benciliden-1,3-tiazolidin-2,4-dionas (serie A) se hizo reaccionar al 4-hidroxibenzaldehído con los halogenuros de metil-arilo adecuadamente sustituidos en medio básico y disolventes polares no próticos para obtener **11-16**. Posteriormente, se llevó a cabo una condensación de Knoevenagel de **11-16** con la tiazolidin-2,4-diona para la obtención de **ACB-1-6**.



Esquema 3. Ruta de síntesis para los compuestos **ACB-1-6**.

Para la síntesis de los derivados del ácido fenilpropanoico (serie B), se llevó a cabo una protección del ácido carboxílico con SOCl_2 y etanol obteniendo **17**. Posteriormente se hizo reaccionar **17** con los halogenuros de metil-arilo adecuadamente sustituidos en medio básico y disolventes polares no próticos, obteniendo los precursores éter-éster **18-21**. Finalmente se realizó una hidrólisis básica en donde se obtuvieron los productos **ACB-7-10**.



Esquema 4. Ruta de síntesis para los compuestos ACB-7-10.

6.2 Parte in silico

6.2.1 Predicción de la actividad biológica: PASS

El programa computacional PASS fue diseñado para predecir algunos tipos de actividad biológica simultáneamente basados en la fórmula estructural de la molécula. Por lo tanto puede estimar los perfiles de actividad biológica para moléculas virtuales, es decir antes de su síntesis química y de las pruebas biológicas. Las estimaciones de PASS del espectro de actividad biológica de nuevos compuestos están basados en los datos de relación estructura-actividad (SAR) de compuestos evaluados experimentalmente y los resultados de esas moléculas de entrenamiento se acumulan en una base de datos para luego ser comparadas con las de prueba.

6.2.2 ACD/Tox Suite

Este software utiliza una metodología basada en el análisis de similitud a través de la estimación del índice de fiabilidad teniendo en cuenta los siguientes dos aspectos: la similitud del compuesto ensayado dentro de un conjunto de moléculas, así como la consistencia de los valores experimentales de toxicidad de compuestos similares resultado de estudios QSAR. Se calcularon los siguientes efectos tóxicos:

- Inhibición de las principales isoformas de CYP450
- Bloqueo de canales hERG (cardiotoxicidad)
- Predicción de la toxicidad aguda mediante el cálculo de la dosis letal media (DL₅₀).

6.2.3 admet-SAR

Es una base de datos de acceso libre en línea (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetsar1/home/>) que contiene información con base en la estructura y la actividad de una gran variedad de fármacos, pesticidas, aditivos alimentarios, y químicos de uso industrial. Esta herramienta recopila, selecciona y administra los datos disponibles de las propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADMET) de la literatura publicada. En admetSAR, más de 210 000 puntos de datos anotados ADMET para más de 96 000 compuestos únicos con 45 tipos de propiedades, proteínas, especies u organismos asociados a ADMET han sido cuidadosamente seleccionados de una gran cantidad de literaturas diversas.

La base de datos proporciona una interfaz fácil de usar para consultar un perfil químico específico, utilizando el número de registro CAS, el nombre común o la similitud estructural. Además, la base de datos incluye 22 clasificaciones cualitativas y 5 modelos de regresión cuantitativa con una precisión altamente predictiva, lo que permite estimar las propiedades ADMET ecológicas / de mamíferos para nuevos productos químicos.⁹⁶

Este software se utilizó para predecir las principales propiedades farmacocinéticas y de toxicidad intrínseca de los compuestos, tales como:

- Absorción intestinal
- Permeabilidad al SNC
- Ser sustrato de glicoproteína P
- Ser sustrato de CYP 450
- Carcinogénesis
- Toxicidad de Ames (genotoxicidad)
- Toxicidad en abejas

6.2.4 DIA-DB

DIA-DB es un servidor web para la predicción de moléculas con potencial efecto antidiabético. Este usa dos diferentes criterios; a) comparación de la similitud con una base de datos de fármacos antidiabéticos y moléculas experimentales y b) mediante un cribado virtual inverso de las moléculas elegidas por el usuario en contra de un conjunto de proteínas implicadas en el proceso de diabetes. Este servidor está abierto a todo tipo de usuarios.⁹⁷

6.2.5 Acoplamiento molecular refinado

El acoplamiento molecular se llevó a cabo sobre los compuestos que resultaron más activos en los ensayos *in vitro* e *in vivo* con los blancos planteados en este trabajo: PPAR γ , GPR40 (FFA1), aldosa reductasa y PTP1B. Las estructuras cristalizadas de estas proteínas se obtienen de la base de datos Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), bajo los códigos de identificación , 1I7I, 4PHU, 3G5E y 1XB0 para cada blanco terapéutico, respectivamente.

Estas proteínas se preparan en el programa computacional MOE, en el que se minimiza su energía y se ioniza a los ligandos. Los cálculos de acoplamiento fueron realizados con AutoDock, versión 4.2. AutoDock realiza un acoplamiento automatizado del ligando semiflexible con el sitio de unión rígido de la proteína. El programa conlleva varias corridas del experimento. Cada corrida proporciona una predicción de modo de unión. Todas las moléculas de agua y los ligandos cristalográficos fueron removidas de la estructura, además todos los átomos de hidrógeno fueron añadidos. Para todos los ligandos y proteínas, fueron asignadas las cargas de Gasteiger y los átomos no polares fueron escondidos. Todas las torsiones fueron consideradas para moverse durante el acoplamiento. El programa auxiliar AutoGrid generó los mapas electrostáticos del grid. Cada grid fue centrado sobre las coordenadas cristalográficas de ligando cristalográfico. Las dimensiones del grid fueron 50 x 40 x 50 Å con un espacio de grid de 0.375 Å. El algoritmo Genético Lamarckiano fue aplicado para la búsqueda usando parámetros ya establecidos. El número de corridas fue de 25. Después del acoplamiento, los resultados fueron reagrupados en grupos con RMSD de 0.5-2 Å. Discovery Studio, versión 4.1, (Accelrys, Inc. San Diego), y Pymol 1.3 fueron utilizados para la visualización.

6.2.5.1 Validación de acoplamiento molecular.

La Validación fue llevada a cabo en AutoDock 4.2, con base en las interacciones importantes hechas por el ligando unido con los aminoácidos del sitio de unión, indicando que los parámetros de simulación de acoplamiento son buenos y reproducen esas interacciones entre la estructura de rayos X de los blancos planteados, tomando en cuenta los modos de unión en donde el RMSD se menor de 2 Å.

6.3 Parte farmacológica

6.3.1 Evaluación *in vitro* del efecto sobre receptores PPAR α/γ y transportador de glucosa tipo 4 (GLUT-4) y FATP-1

Ensayo de funcionalidad celular

Se aplicó el ensayo de viabilidad sobre la línea celular 3T3-L1 mediante el kit CellTiter96 AQueous One Solution Cell proliferation Assay, distribuido por Promega con el fin de determinar si los compuestos son citotóxicos a las concentraciones empleadas.

Esta técnica se basa en el uso de MTT (bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolo), el cual al ser reducido por deshidrogenasas genera un agente colorido llamado formazan. La concentración de formazan se midió a una absorbancia de 490 nm que es proporcional al número de células metabólicamente activas.

Se emplearon cuatro concentraciones de cada uno de los compuestos 1, 10, 100 y 1000 μM por un periodo de 24 h. Los resultados de absorbancia se expresaron como porcentaje de viabilidad.

Cultivo celular de 3T3-L1

Fibroblastos 3t3-L1 (9×10^5 células por pozo) fueron sembradas en placa de 6 pozos (Corning Incorporated, NY, USA) en medio DMEM adicionado con 25 mM de glucosa, 10% de suero fetal bovino (v/v), 1 mM de piruvato sódico, 2 mM de glutamina, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, y gentamicina, bajo una atmósfera humidificada al 5% de CO_2 , a 37 °C. Después de dos días de confluencia, las células se diferenciaron fenotípicamente a adipocitos con 0.5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina, 0.25 μM de acetato de dexametasona, y 0.8 μM de insulina por 48 h, seguido por insulina sola por 48 h más. El medio de cultivo sin insulina será reemplazado cada dos días durante 8 días de diferenciación.⁹⁸ Para determinar el efecto de los compuestos sobre la expresión de los PPARs y GLUT-4, las células serán tratadas por 24 h.

Aislamiento de RNA total y cuantificación de la expresión de RNA's mensajeros

El ARN se aisló de las células de cultivo usando el reactivo de aislamiento TriPure (Invitrogen). La absorbancia se midió a 260 y 280 nm para cada muestra de ARN y la relación de absorbancia (260-a-280 nm) es de 1.9 ± 0.2 . Para confirmar la integridad del ARN, 1 μg fue corrido en de gel de agarosa al 1%. El ARN se reveló con bromuro de etidio y se visualizó utilizando el Image Gel-Logic 212 Pro (Kodak/Caarestream). Dos bandas ribosomales grandes (28S y 18S) pero no el ARN degradado son detectadas. Dos

microgramos del ARN total se transcribirá inversamente usando el ImProm II reverse transcription system (Promega, Madison, WI, USA), la reacción (20 μ L) se incubó en un termociclador (BioProducts, West Palm Beach, FL, USA), bajo el siguiente programa de ciclos: incubación a 25 °C por 5 min, hasta 42 °C por 55 min. La enzima fue inactivada a 70°C, por 15 min, y finalmente las muestras se enfriaron a 4 °C, por 5 min. Entonces un volumen 1/10 de cada reacción fue amplificado usando SYBR Green master mix (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) conteniendo 0.5 mM de cebadores personalizados de **PPAR- γ** (F-CCAGAGTCTGCTGATCTGCG; R-GCCACCTCTTTGCTCTGCTC; Gene Bank NM_011146.1), **PPAR- α** (F-ATGCCAGTACTGCCGTTTTTC; RGGCCTTGACCTTGTTTCATGT; Gene Bank NM_011144), **GLUT-4** (FGATTCTGCTGCCCTTCTGTGTC; R ATTGGACGCTCTCTCTCCAA; Gene Bank NM_009204.2), así como la enzima de iniciación rápida, buffer para PCR y 3.5 mM MgCl₂, en un volumen final de 10 μ L, las reacciones fueron medidas en un Rotor- Gene de tiempo-real (Corbett Life Science, Concorde NSW, Australia). Los PCR se llevó a cabo usando las siguientes condiciones de ciclos: pre-incubación y desnaturalización a 95 °C durante 10 min. El umbral de ciclos (Ct) se midió usando tubos separados y por duplicado. La identidad y pureza de los productos de ampliación fue monitoreado por electroforesis en gel de agarosa al 2 %. La curva de fusión se analizó al inicio de la amplificación siguiendo las condiciones tal cual lo indica la compañía (Thermo scientific). Para asegurar la calidad de las mediciones, cada ensayo incluye un control negativo para cada gen. La cantidad de ARNm de cada adipocito se normalizó de acuerdo a la cantidad de ARNm ribosomal que codifica para la proteína 36B4 F-AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT; RCCGCAGGGGCAGCAGTGTT; Gene Bank NM_007475.2).

Los valores de Δ Ct se calcularon en cada muestra de cada gen de interés como se menciona a continuación: Ct gen de interés – Ct gen de referencia (β - actina como el gen de referencia, el cual se mantendrá estable durante todo el experimento). Los cambios relativos en los niveles de expresión de un gen en específico ($\Delta\Delta$ Ct) son calculados como Δ Ct del grupo prueba menos Δ Ct del grupo control y entonces presentado $2^{-\Delta\Delta$ Ct.⁹⁹

6.3.2 Ensayo antidiabético (Modelo murino de diabetes mellitus no insulino dependiente)

Ratones CD-1 fueron provistos por la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Los animales (20-25 g) fueron divididos en grupos de 6 (n=6) en condiciones controladas (ciclos de 12 h luz/oscuridad, 25 \pm 2° C y 45-65% de humedad. El

modelo murino de diabetes no insulino-dependiente es inducido en ratones con ayuno de 16 h. Todos los animales fueron manejados de acuerdo a la Regulación Federal Mexicana de Experimentación y Cuidado de animales (SAGARPA, NOM-062-ZOO-199, México).

6.3.2.1 Inducción de la diabetes

La estreptozotocina (STZ) es disuelta en un buffer de citratos (pH 4.5) y la nicotinamida disuelta en una solución salina fisiológica isotónica. El modelo murino de diabetes no insulino-dependiente es inducido en ratones con ayuno de 16 h a través de una sola inyección intraperitoneal de 100 mg/kg de estreptozotocina, 15 min después de la administración i.p de 40 mg/kg de nicotinamida.

La hiperglucemia es confirmada por la elevación de la concentración de glucosa en plasma, determinada a las 72 h por un glucómetro. Los animales con concentraciones de glucosa sanguínea más alto que 200 mg/dL, son empleados para la búsqueda de compuestos antidiabéticos.

6.3.2.2 Evaluación de compuestos sobre modelo murino de diabetes

Los animales diabetizados son divididos en grupos de cinco animales cada uno (n=5). A los ratones del grupo experimental se les administra una suspensión del compuesto a probar (preparados en 10% Tween 80) vía intragástrica (100 mg/kg peso de rata). Los animales del grupo control son también administrados con una solución de Tween 80 al 10%. Glibenclamida (3 mg/kg) fue empleado como fármaco hipoglucémico. Las muestras sanguíneas son recolectadas de la vena caudal a las 0, 1, 3, 5, y 7 h después de la administración.

La concentración de glucosa sanguínea se estima por un método enzimático de glucosa oxidasa usando un glucómetro comercial (Accu-Chek, Performa, Roche®). El porcentaje de variación de la glucemia de cada grupo es calculado con relación al nivel inicial (0 h), de acuerdo a: %Variación de glucemia = $[(G_x - G_0)/G_0] \times 100$, donde G_0 son los valores iniciales de glucemia y G_x son los valores de glucemia a la +1, +3, +5 y +7 h, respectivamente. Todos los valores son expresados como promedio \pm E.E. La significancia estadística será estimada por ANOVA de $p < 0.05$ y $p < 0.01$ implica significancia.¹⁰⁰

6.3.3 Ensayos de inhibición sobre PTP1B.

Todos los experimentos se realizaron usando la enzima PTP1B recombinante humana purificada y a 37°C. El sustrato (*p*-nitrofenilfosfato) se disolvió en 0.075M de buffer β , β -dimetilglutarato a pH 7.0, con 1mM EDTA y 5mM de ditiotreitol. El volumen final fue de 1mL.

Las reacciones se iniciaron al agregar alícuotas de la enzima (0.16 µg por cada ensayo), y fueron terminadas a tiempos adecuados utilizando 4 mL de KOH 1M. La liberación de *p*-nitrofenol se determinó leyendo la absorbancia a 400 nm ($\epsilon = 18,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para probar la capacidad de los compuestos de inhibir a esta enzima se disolvieron en DMSO preparando una solución inicial de 20 mM. Alícuotas de cada solución inicial de los compuestos **ACB-1-10** fueron diluidos en una solución de 40 µM de buffer que contenía 2mM de (*p*-nitrofenilfosfato); la mezcla se incubó y la reacción al añadir la alícuota apropiada de la enzima. La cinética enzimática se determinó midiendo las velocidades iniciales usando ocho diferentes concentraciones del sustrato (0.5-40 mM).

La CI_{50} se determinó midiendo la velocidad de hidrólisis de pNPP utilizando una concentración fija de este igual al valor de K_m de la enzima. Los datos se ajustaron a la siguiente ecuación utilizando el programa FigSys:

$$y = \frac{Max - Min}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^{slope}} + Min$$

Donde $y = v_i/v_o$, es decir, la relación entre la actividad medida en presencia del inhibidor (v_i) y la actividad del control sin el inhibidor (v_o), x es la concentración del inhibidor. Cada ensayo fue llevado a cabo por triplicado. Los datos reportados representan la medida de media +/- S.E.M.

6.3.4 Aldosa reductasa

Para este ensayo se utilizó aldosa recombinante humana la cual fue purificada por homogeneidad electroforética.^{90,91} La enzima purificada (actividad específica 5.0 U/mg) fue almacenada a -80°C en un buffer de fosfato de sodio 10 mM pH 7 que contiene ditiotreitól 2 mM y glicerol al 30 % (m/v). La enzima fue lavada con un buffer de fosfato de sodio 10 mM pH 7 antes de ser utilizada. La actividad enzimática fue medida a 37°C por un decremento de la absorbancia a 340 nm. La mezcla de ensayo (volumen final 0.7 mL) contenía, buffer de fosfato de sodio 0.25 mM pH 6.8, D, L-gliceraldehído 4.67 mM, NADPH 0.11 mM, sulfato de amonio 0.38M y EDTA 0.5 mM. Una unidad de enzima se refiere a la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1µmol/min de NADPH en estas condiciones.

6.3.5 Ensayo *in vitro* sobre GPR40

Se sembraron aproximadamente 4×10^4 hGPR40/HEK293 por pozo en una placa de 96 pozos. Después de cultivar durante 24 horas, las células se cargan con 2 mol/L de Fluo-4 AM en solución salina equilibrada de Hanks (5.4 mmol/L KCl, 0.3 mmol/L Na_2HPO_4 , 0.4

mmol/L de KH_2PO_4 , 4.2 mmol/L NaHCO_3 , 1.3 mmol/L CaCl_2 , 0.5 mmol/L de MgCl_2 , 0.6 mmol/L Mg_2SO_4 , 137 mmol/L de NaCl , 5.6 mmol/L de D-glucosa, 250 mmol/L sulfipirazona, a un pH 7.4) a 37 ° C durante 40 minutos. Posteriormente se realiza un lavado a fondo con 50 μL buffer de ensayo. Se adicionaron 25 μL de buffer de ensayo con los compuestos **ACB-1-10** en el pozo (100 μM), usando un lector de microplacas FlexStation III (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) la movilización de calcio intracelular se registró a una longitud de onda excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 525 nm.

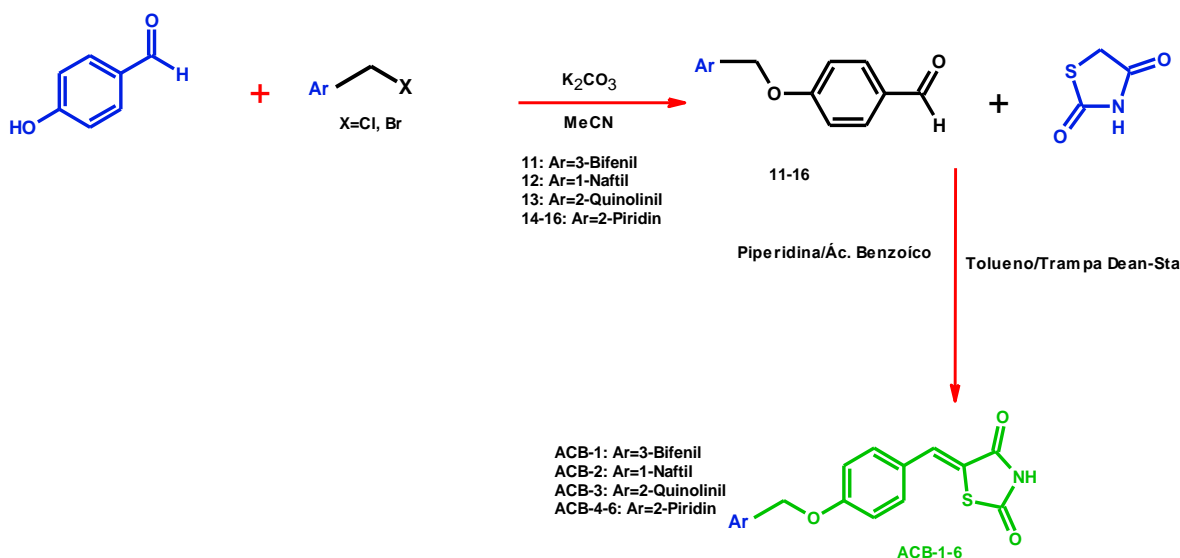
Utilizando un FlexStation III lector de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.) se registra el cambio de calcio intracelular del receptor en una longitud de onda de excitación de 485 nm y longitud de onda de emisión de 525 nm.

7. RESULTADOS

7.1 PARTE QUÍMICA

7.1.1 Síntesis de benciliden-1,3-tiazolidin-2,4-dionas ACB-1-6 (serie A)

Para la síntesis de las benciliden-1,3-tiazolidin-2,4-dionas (serie A) se hizo reaccionar al 4-hidroxibenzaldehído con los halogenuros de metil-arilo adecuadamente sustituidos en medio básico y disolventes polares no próticos para obtener **11-16**. Posteriormente, se llevó a cabo una condensación de Knoevenagel de **11-16** con la 2,4-tiazolidindiona para la obtención de **ACB-1-6**.

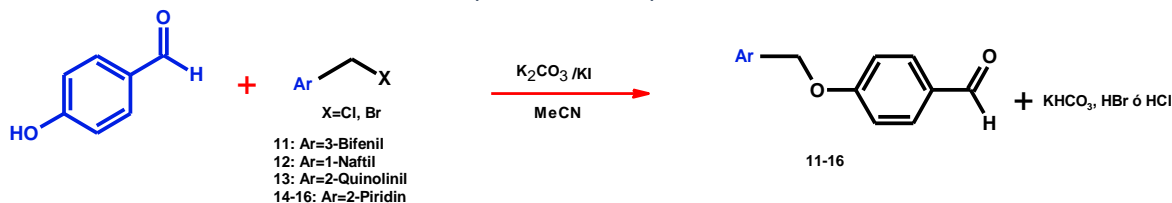


Esquema 5. Ruta de síntesis para los compuestos **ACB-1-6**.

7.1.1.2 Síntesis de (aril-metiloxi)benzaldehydos **11-16**

En la Tabla 2 se muestra que los precursores (aril-metiloxi)benzaldehydos **11-16** se obtuvieron en rendimientos del 32 al 85% que se consideran de discretos a altos, con tiempos de reacción de 5 a 17 h. Todos los compuestos se obtuvieron en forma de cristales mediante recristalización en diferentes disolventes y con puntos de fusión característicos de pureza.

Tabla 2. Propiedades de los precursores 11-16

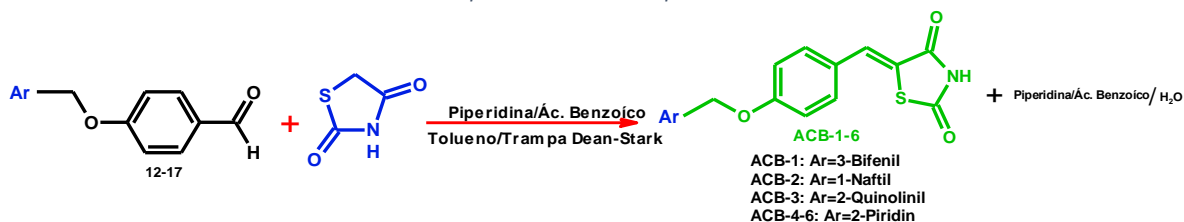


Clave	Ar	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento (%)	Punto de fusión (°C)	Apariencia
Serie A					
11	3-Bifenil	11	32	63-64.1	Cristales blancos
12	1-Naftil	5	85	104.2-106.3	Cristales blancos
13	2-Quinolilil	6.5	60	82-84.2	Cristales amarillo claro
14	2-Piridin	10	64	88.9-91.1	Cristales beige algodonosos
15	2-Pridin-3,5-CH ₃ ; 4-OCH ₃	12	69	91.8-92.6	Cristales beige algodonosos
16	Piridin-3-CH ₃ , 4-OCH ₂ -CF ₃	17	70	118.6-120.5	Cristales ámbar

Una vez obtenidos los precursores **11-16** se hicieron reaccionar con la 1,3-tiazolidin-2,4-diona mediante una condensación de Knoevenagel utilizando piperidina como base, ácido benzoico y tolueno como disolvente.

Para la síntesis de los compuestos finales **ACB-1-6** se llevó una modificación en los equivalentes empleados de piperidina y ácido benzoico aumentando de 0.3 a 0.4, esto debido a que no se observó el consumo total de las materias primas; sin embargo, no se observó un cambio considerable de los mismos.

Los compuestos finales **ACB-1-6** se obtuvieron en forma de sólidos con rendimientos entre 69 y 90% y tiempos de reacción de 8 a 20 h. Por otro lado, se observaron puntos de fusión característicos de pureza de entre 218 y 242 °C (Tabla 3).

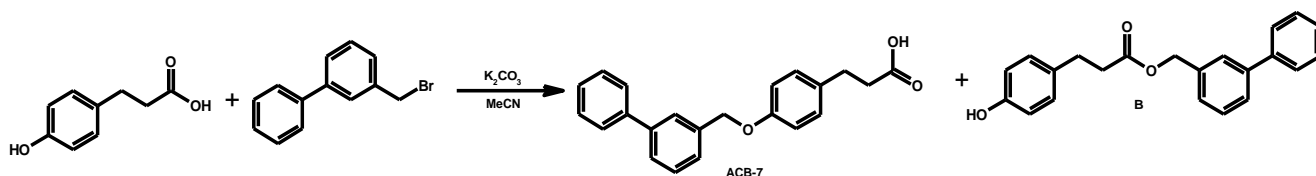
Tabla 3. Propiedades de los compuestos **ACB-1-6**

Clave	Ar	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento (%)	Punto de fusión (°C)	Apariencia
Serie A					
ACB-1	3-Bifenil	18	86	218.7-220	Sólido amarillo claro
ACB-2	1-Naftil	14	84	242.6-244.4	Sólido amarillo claro
ACB-3	2-Quinolilil	18	77	223 dc	Sólido amarillo claro
ACB-4	2-Piridin	20	69	219.9 dc	Sólido beige
ACB-5	2-Piridin-3,5-CH ₃ ; 4-OCH ₃	8	90	235.6-238.2	Sólido amarillo claro
ACB-6	Piridin-3-CH ₃ , 4-OCH ₂ -CF ₃	14	79	225.9-228.2	Sólido beige

*dc: punto de descomposición

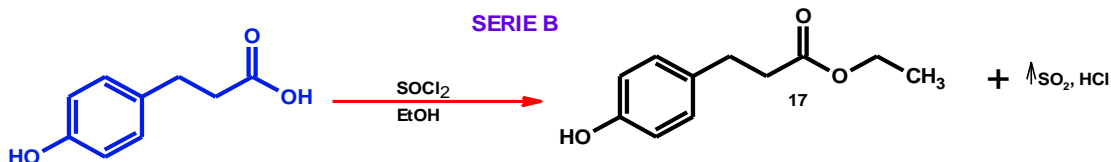
7.1.2 Metodología general de síntesis de los derivados del ácido fenilpropanoico **ACB-7-10** (serie B).

Para la síntesis del compuesto **ACB-7** inicialmente se pensó en una síntesis de un solo paso. En esta se hizo reaccionar el ácido 3-(4-hidroxifenil)propanoico con el 3-(bromometil)bifenilo en un disolvente polar no prótico como el acetonitrilo (MeCN) y carbonato de potasio como base (K₂CO₃). Sin embargo, en la cromatografía de capa fina se observó la formación de dos productos **ACB-7** y **B**, el cual probablemente se trate del producto del ataque nucleofílico del ácido carboxílico al (bromometil)bifenilo. Lo anterior, se podría atribuir a que el pKa de los ácidos carboxílicos (3-5) es menor que el del fenol (10) por lo que se desprotona primero por acción de K₂CO₃ que el ácido carboxílico; no obstante este es menos nucleofílico que el fenol. (Esquema 6).



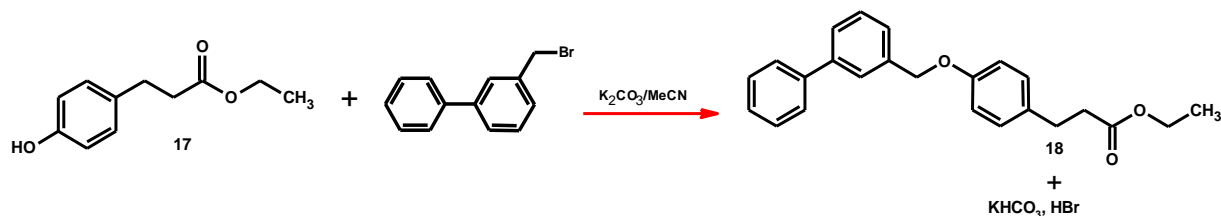
Esquema 6. Probables productos de la síntesis de **ACB-7**

Debido a lo anterior, se propuso una ruta de síntesis alterna. Para esto se llevó a cabo una protección del ácido carboxílico mediante una esterificación con cloruro de tionilo (SOCl_2) y etanol a temperatura ambiente generando el precursor **17**. Este producto se obtuvo en forma de líquido con un rendimiento del 94% y un tiempo de reacción de 8 h.

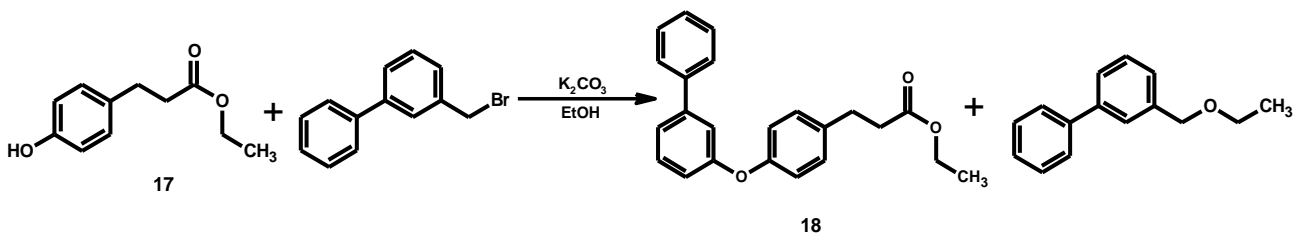
Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del compuesto **17**

Clave	Estructura	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento (%)	Punto de fusión (°C)	Purificación	Apariencia
17		8	94	----	Cromatografía en columna	líquido amarillo claro

Una vez obtenido el precursor **17**, mediante una reacción $\text{S}_{\text{N}}2$ se obtuvo el precursor **18**. Sin embargo este mostró un alto tiempo de reacción así como un bajo rendimiento químico del 26%.

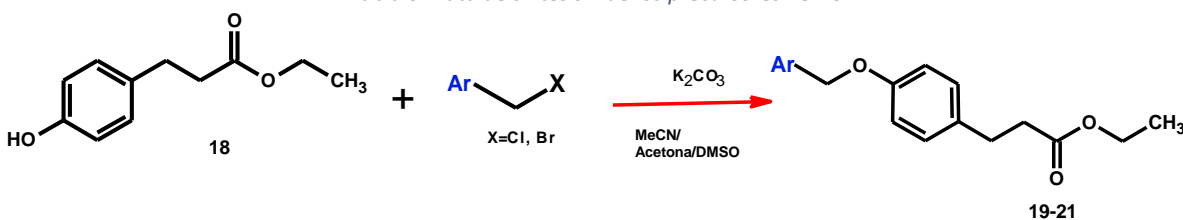
Esquema 7. Ruta de síntesis del compuesto **19**

Debido al bajo rendimiento obtenido del precursor **18**, se llevó a cabo la obtención del compuesto mediante una reacción $\text{S}_{\text{N}}1$ utilizando etanol como disolvente. De esta manera se esperaba un menor tiempo de reacción. No obstante, se observó la formación de dos productos ya que el etanol puede actuar como nucleófilo compitiendo con el fenol proceso conocido como solvolisis (Esquema 8). Por lo tanto, se decidió obtener el compuesto a través de la reacción $\text{S}_{\text{N}}2$ con disolventes distintos al acetonitrilo.

Esquema 8. Ruta de síntesis de **18** mediante una reacción SN_1

7.1.2.1 Síntesis de los precursores 18-20

Una vez obtenido el precursor **18**, se llevó a cabo una reacción SN_2 para obtener los precursores ésteres-éteres **18-20**. De manera inicial se llevó a cabo la sustitución nucleofílica molecular en disolventes como acetona y acetonitrilo; sin embargo no se observó el consumo total de las dos materias primas además de bajos rendimientos, por tal motivo se decidió utilizar disolventes más polares y con un punto de ebullición mayor. Dado esto, para la síntesis del compuesto **20** se utilizó DMSO como disolvente, sin embargo se observó la descomposición del producto tornándose de un color marrón oscuro. Por lo tanto se utilizaron disolventes con un punto de ebullición mayor al acetonitrilo pero menor al DMSO.

Tabla 5. Ruta de síntesis 1 de los precursores **18-20**

Clave	Ar	Tiempo de reacción (h)	Disolvente	Punto de fusión (°C)	Rendimiento (%)	Apariencia
Precursores 18-21						
18	3-Bifenil	48	Acetona	----	<10	líquido anaranjado
19	1-Naftil	10	Acetonitrilo	---	40	Líquido amarillo
20	4-Bifenil-2-carbonitrilo	18	DMSO	---	<10	Sólido café claro

En la Tabla 6 se reportan los rendimientos así como los tiempos de reacción de los compuestos **18-20** obtenidos con disolventes como dimetilformamida y diglima. En cuanto a los rendimientos estos resultaron mayores (52-78%) a los obtenidos con acetonitrilo así mismo los tiempos de reacción fueron menores de 5-26 h. Todo lo anterior es debido a que

en las sustituciones bimoleculares en disolventes apróticos con alta constante dieléctrica son más rápidas ya que los iones están disociados, pero los aniones no están solvatados. Por otro lado, al tener un disolvente con mayor punto de ebullición se puede aportar mayor energía al sistema.

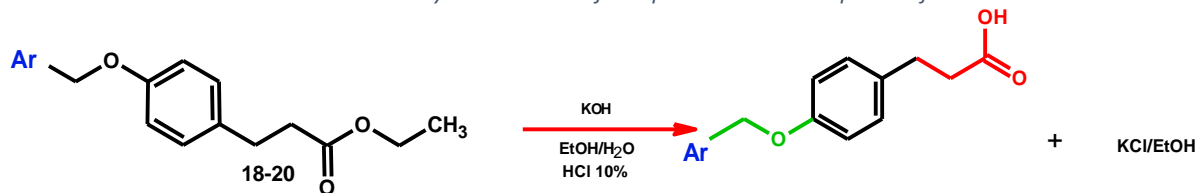
Tabla 6. Condiciones de reacción y características fisicoquímicas de los precursores 18-21

Clave	Ar	Disolvente	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento (%)	Punto de fusión (°C)	Purificación	Apariencia
<p>Serie B</p>							
18	3-Bifenil	Dimetilformamida	26	65	----	Cromatografía en columna	Líquido incoloro
19	1-Naftil	Dimetilformamida	6	78	----	Cromatografía en columna	Líquido incoloro
20	4-Bifenil-2-carbonitrilo	Diglima	5	64	66.6-68.6	Cromatografía en columna y recristalización	Cristales blancos
21	2-Quinolinil	Diglima	9	72	----	Cromatografía en columna	Líquido amarillo claro

7.1.3 Síntesis de los compuestos finales ACB-7-10

Para la síntesis de los compuestos finales **ACB-7-10** se llevó a cabo una hidrólisis básica con hidróxido de potasio (KOH) en etanol:agua proporción 50:50, posterior a la hidrólisis se trata la reacción con HCl al 10% hasta llegar a un pH entre 3-5 para regenerar el protón del ácido carboxílico. Los compuestos finales **ACB-7-10** se obtuvieron con rendimientos de moderados a buenos 51-95%, con tiempos de reacción de 3-5 h y puntos de fusión característicos de pureza.

Tabla 7. Condiciones de síntesis y características fisicoquímicas de los compuestos finales ACB-7-10



ACB-7: Ar=3-Bifenil
 ACB-8: Ar=1-Naftil
 ACB-9: Ar=4-Bifenil-2-carbonitrilo
 ACB-10: Ar=2-Quinolinil

Clave	Ar	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento (%)	Purificación	Punto de fusión (°C)	Apariencia
Serie B						
ACB-7	3-Bifenil	5	83	Recristalización etanol	123.7-126	Hojuelas blancas nacaradas
ACB-8	1-Naftil	5	51	Recristalización metanol: hexano 95:5	124.8-127.8	Sólido blanco
ACB-9	4-Bifenil-2-carbonitrilo	3	85	Recristalización etanol	174-176.9	Hojuelas blancas nacaradas
ACB-10	2-Quinolinil	3	95	Recristalización metanol	125.8-128.4	Cristales beige

7.1.4 Caracterización estructural

Posteriormente a la purificación de los compuestos sintetizados **ACB-1-10**, se llevó a cabo la identificación estructural de los mismos, para lo cual se emplearon métodos espectroscópicos (RMN) y espectrométricos (EM), mismos que permitieron corroborar que las estructuras de dichos compuestos correspondían a las de los diseñados y sintetizados en este proyecto.

7.1.4.1 Resonancia magnética nuclear ^{13}C y ^1H

A continuación, a manera de ejemplo de la caracterización estructural, se muestran los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C del compuesto **ACB-7**.

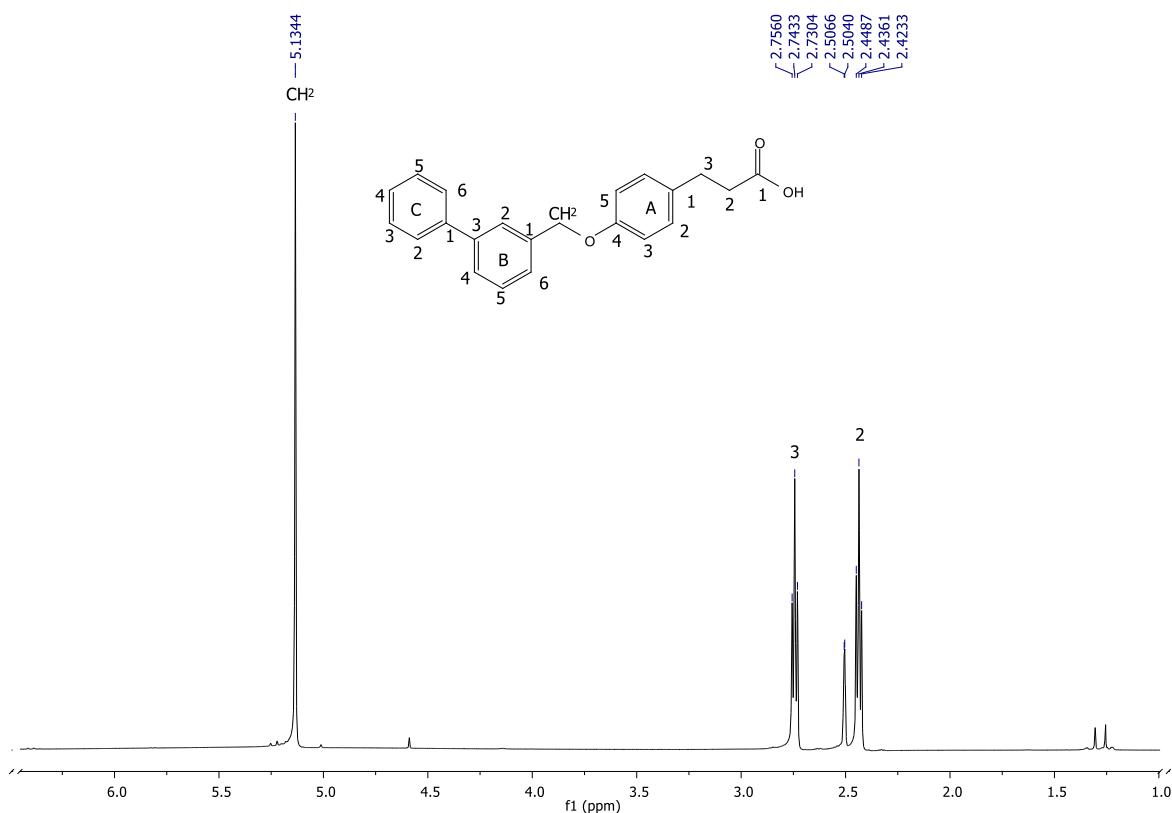


Figura 34. Espectro de RMN ^1H del compuesto **ACB-7**.

En el espectro de RMN ^1H del compuesto **ACB-7**, se observan dos tripletes de los protones alifáticos de la posición 3 y 2 a un desplazamiento de 2.74 y 2.43 respectivamente. Por otro lado a un desplazamiento de 5.13 se observa un singulete que corresponde a los protones del metileno (CH_2) del bencilo.

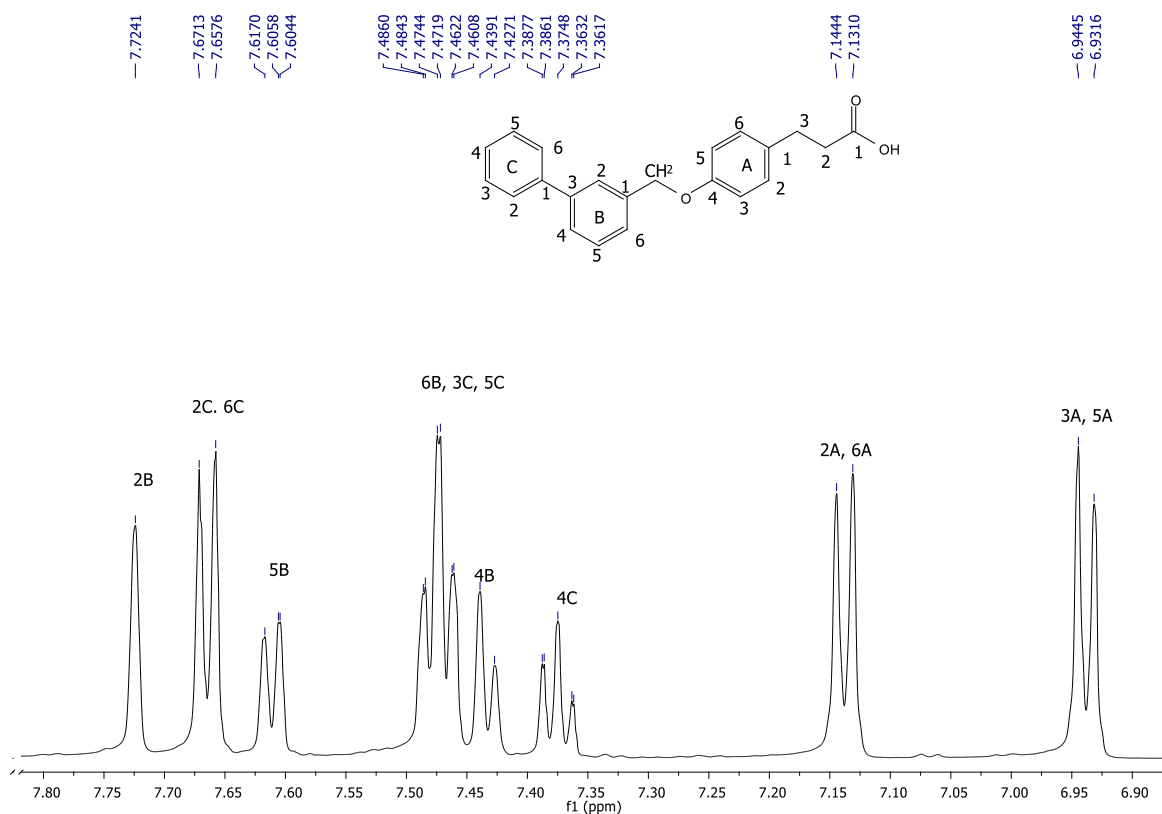


Figura 35. Expansión de la zona aromática del espectro de RMN ^1H del compuesto **ACB-7**

En la Figura 35 se presenta una expansión de RMN ^1H del compuesto **ACB-7** de la zona aromática. En donde podemos observar un sistema *para* del anillo A: un doblete a un desplazamiento de 7.14, que integra para los protones 3,5 con una constante *orto* de 8.04 Hz y otro doblete menos desplazado para los protones 2,6 en 6.94 ppm con una constante *orto* de 7.74 Hz.

Para el anillo bifenilo se observan señales más desplazadas. Para el anillo B a un desplazamiento de 7.72 ppm se observa un singulete correspondiente al protón de la posición 2, para la posición 5 se encuentra un triplete ligeramente desdoblado en 7.61 con una constante *orto* de 7.56 Hz, en la posición 4 a un desplazamiento de 7.43 con una constante *orto* de 7.2 Hz.

Por otro lado, se observa un multiplete que integra para los protones 3, 5 del anillo C y 6 del anillo B a un desplazamiento de 7.48-7.46 ppm. Para el protón 4 del anillo C se observa un triplete a desplazamiento en 7.4 con $J_o = 7.74$ Hz. Para los protones 2,6 se reporta doblete a un desplazamiento en 7.66 y $J_o = 8.22$ Hz.

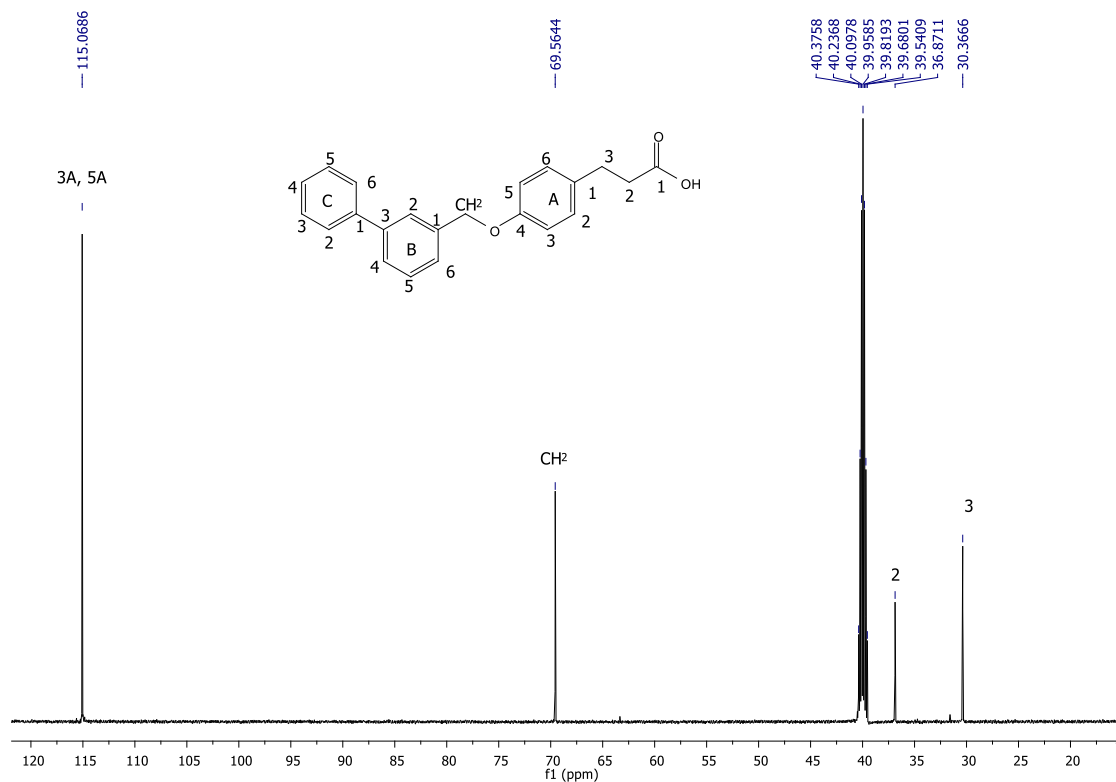


Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **ACB-7**.

A continuación se presenta un espectro de RMN ^{13}C del compuesto **ACB-7**. A un desplazamiento de 174.7 se observa una señal del carbono 1 correspondiente al carbonilo del ácido carboxílico. Por otro lado, se observa una señal en 157 ppm correspondiente al carbono de la posición 4 del anillo A. En la zona alifática se observa en 69.6 ppm la señal correspondiente al carbono del metileno unido a oxígeno y en 30.4 y 36.9 se presentan las señales de los carbonos 3 y 2 respectivamente.

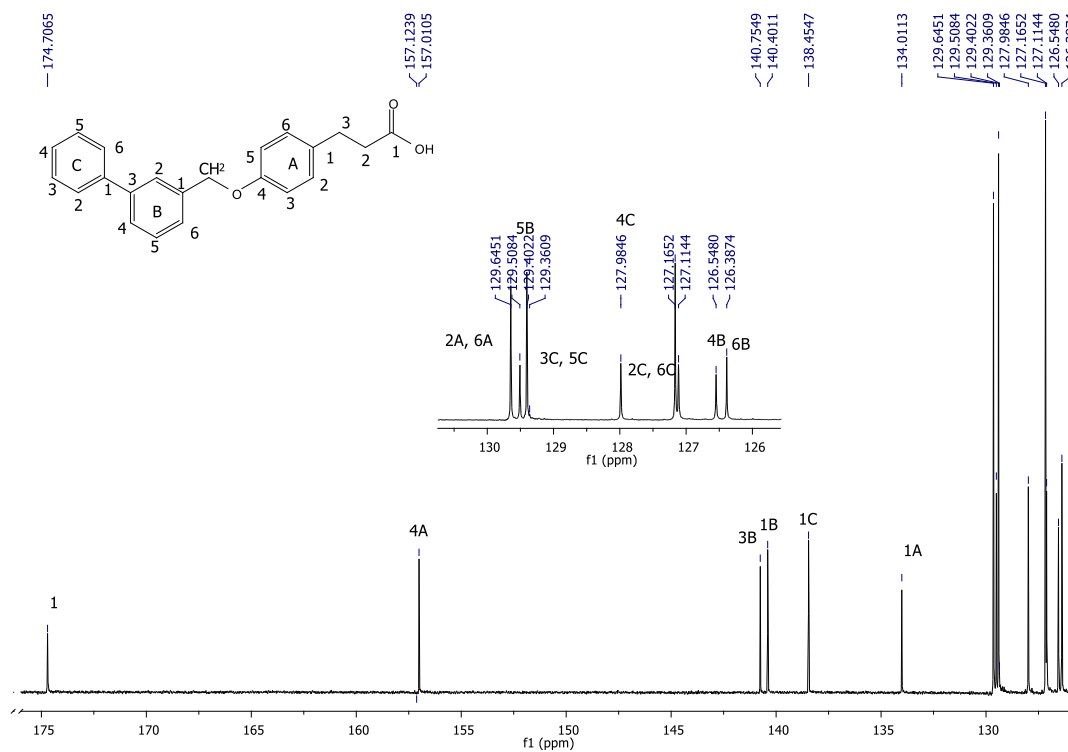


Figura 37. Expansión de la zona aromática del espectro de RMN ¹³C del compuesto ACB-7.

A continuación, a manera de ejemplo de la caracterización estructural un espectro de masas en modalidad impacto electrónico del compuesto final ACB-7.

7.1.4.2 Espectrometría de masas

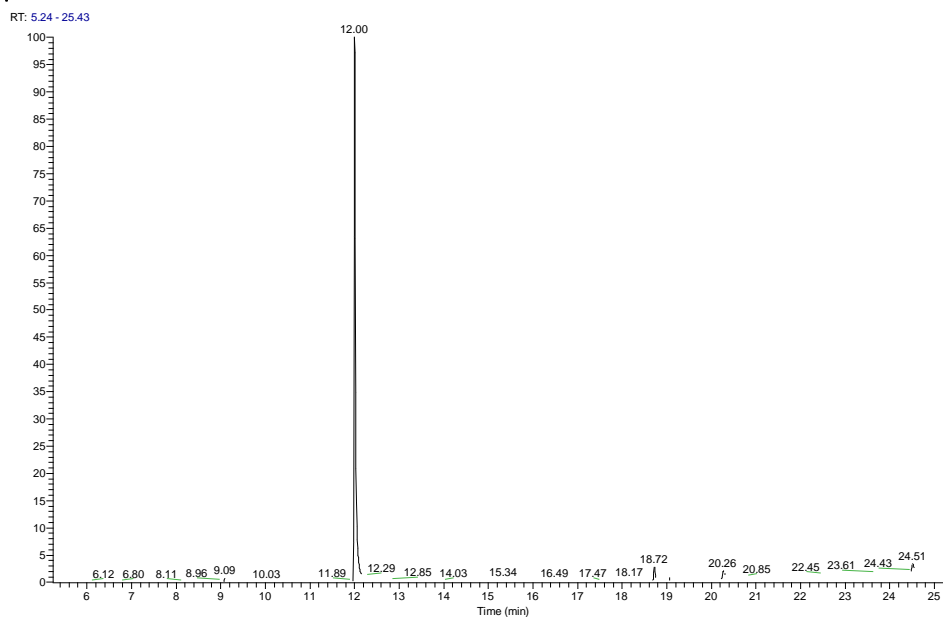


Figura 38. Cromatograma del compuesto ACB-7.

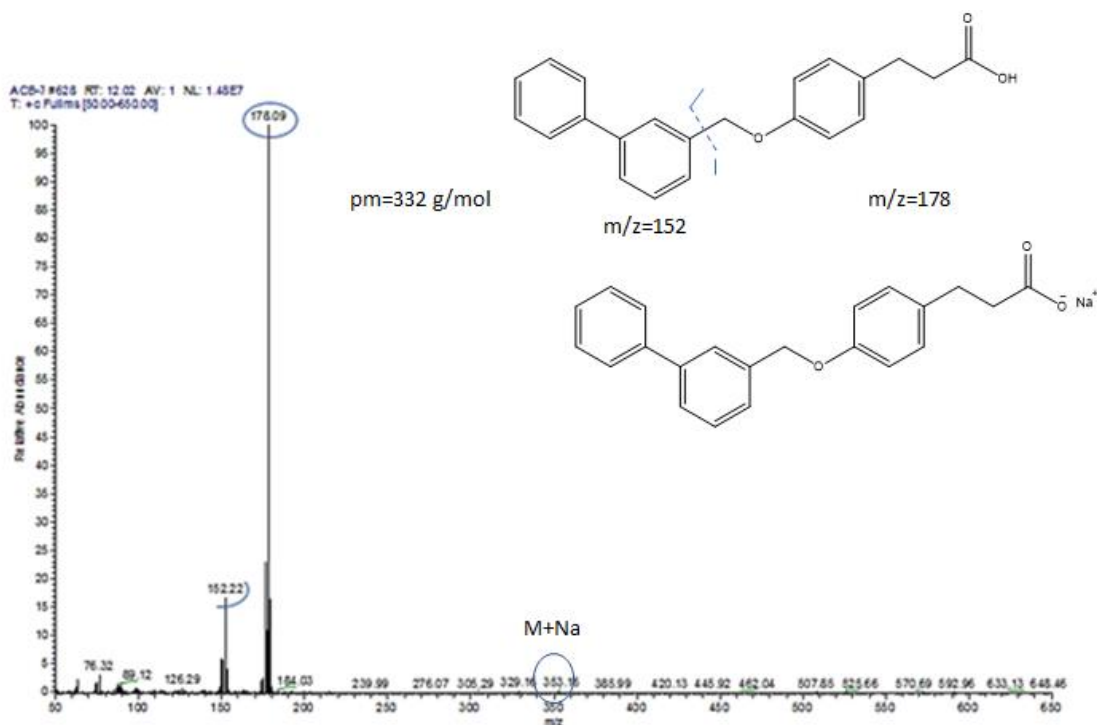
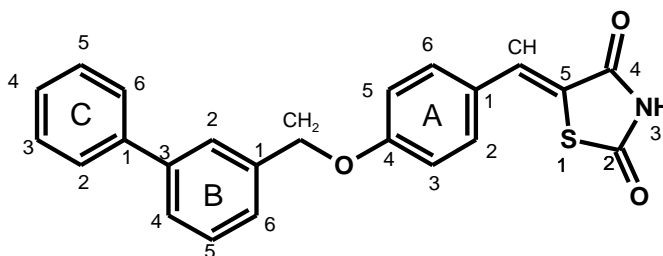


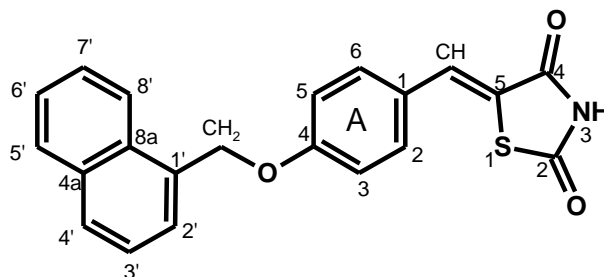
Figura 39. Espectro de masas IE del compuesto **ACB-7**.

En el espectro de masas IE del compuesto **ACB-7** (Figura 39) se muestra el pico base [178] correspondiente a una fragmentación del enlace entre el anillo de bifenilo y el metileno. Por otro lado se observa un pico en [152] que corresponde al anillo de bifenilo, asimismo se observa el ión molecular en forma de sal sódica M+Na a una m/z= [353].

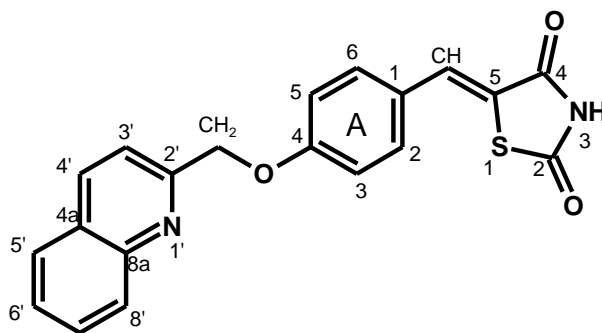
A continuación se muestran los desplazamientos de ^1H y ^{13}C RMN de los compuestos **ACB-1-10**.

Tabla 8. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-1

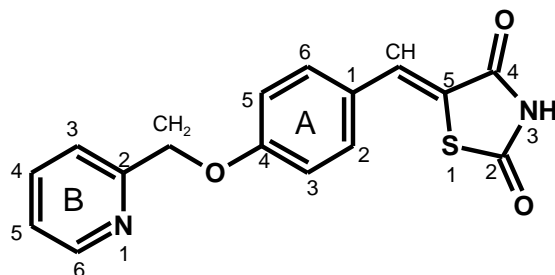
Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-1		
Posición	δ , mult, H, J	δ
	^1H	^{13}C
1	----	----
2	----	168.4
3 (NH)	12.56, s, 1H	----
4	----	167.9
5	----	120.9
CH	7.79, s, 1H	128
A		
1	----	
2	7.59, d, 2H, 8.76	132.5
3	7.24, d, 2H, 8.76	116.2
4	----	160.5
5	7.24, d, 2H, 8.76	116.2
6	7.59, d, 2H, 8.76	132.5
CH ₂	5.29, s, 2H	70
B		
1	----	140.3
2	7.78, s, 1H	126.6
3	----	140.8
4	7.54-7.48, m, 4H	126.8
5	7.67, d, 1H, 7.56	129.6
6	7.54-7.48, m, 4H	126.2
C		
1	----	137.7
2	7.70, d, 2H, 7.5	129.4
3	7.54-7.48, m, 4H	127.2
4	7.41, t, 1H, 7.38	127.3
5	7.54-7.48, m, 4H	127.2
6	7.70, d, 2H, 7.5	129.4

Tabla 9. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-2

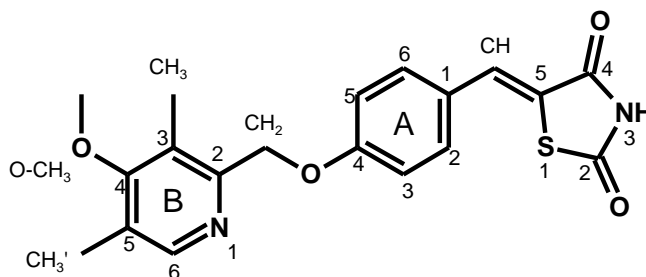
Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-2		
Posición	δ , mult, H, J	δ
	^1H	^{13}C
1	----	----
2	----	168.4
3 (NH)	12.55, s, 1H	----
4	----	167.9
5	----	120.9
CH	7.79, s, 1H	127.3
A		
1	----	127
2	7.66-7.58, m, 4H	132.5
3	7.29, d, 2H, 8.64	116.2
4	----	160.6
5	7.29, d, 2H, 8.64	116.2
6	7.66-7.58, m, 4H	132.5
CH ₂	5.66, s, 2H	68.5
Naftaleno		
1'	----	133.7
2'	7.66-7.58, m, 4H	129
3'	7.54, t, 1H, 8.04	125.8
4'	7.97, d, 1H, 8.22	131.5
4a	----	132.4
5'	8.01, d, 1H, 8.1	129.3
6'	7.66-7.58, m, 4H	126.2
7'	7.71, d, 1H, 6.96	126.5
8'	8.11, d, 1H, 8.04	124.2
8a	----	132.2

Tabla 10. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-3

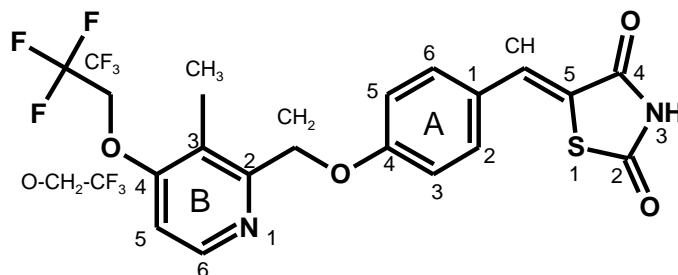
Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-3		
Posición	δ , mult, H, J	δ
	^1H	^{13}C
1	----	----
2	----	168.4
3 (NH)	12.53, s, 1H	----
4	----	168
5	----	120
CH	7.75, s, 1H	127.6
A		
1	----	127.1
2	7.57, d, 2H, 8.8	132.6
3	7.24, d, 2H, 8.88	116.2
4	-----	160.3
5	7.24, d, 2H, 8.88	116.2
6	7.57, d, 2H, 8.8	132.6
CH ₂	5.43, s, 2H	71.4
Quinolina		
1'	----	----
2'	----	157.4
3'	7.68, d, 1H, 8.46	121.1
4'	8.43, d, 1H, 8.46	137.6
4a	----	129
5'	8.0, d, 1H, 8.28	128.6
6'	7.63, dd, 1H,	126.4
7'	7.8, dd, 1H, 8.4 (7-8), 6.96 (7-6), 1.44 (7-5),	132.1
8'	8.03, d, 1H, 8.52	130.4
8a	----	147.4

Tabla 11. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-4

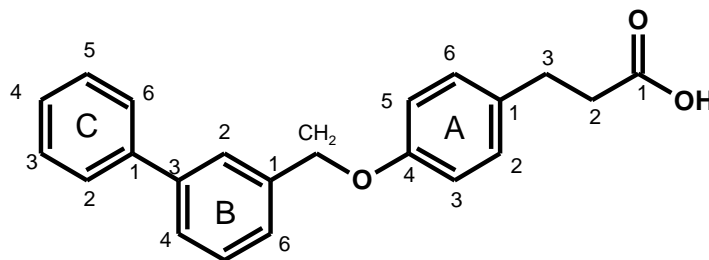
Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-4		
Posición	δ , mult, H, J	δ
	^1H	^{13}C
1	----	----
2	----	168.4
3 (NH)	12.53, s, 1H	----
4	----	167.9
5	----	121.0
CH	7.75, s, 1H	137.5
A		
1	----	160.2
2	7.56, d, 2H, 8.58	132.5
3	7.19, d, 2H, 8.58	116.1
4	----	126.3
5	7.19, d, 2H, 8.58	116.1
6	7.56, d, 2H, 8.58	132.5
CH ₂	5.26, s, 2H	70.9
B		
1	----	----
2	----	156.5
3	7.53, d, 1H, 7.8	123.5
4	7.85, t, 1H, 7.62	132.1
5	7.36, t, 1H, 5.36, 6.9	122.2
6	8.60, d, 2H, 4.44	149.6

Tabla 12. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-5

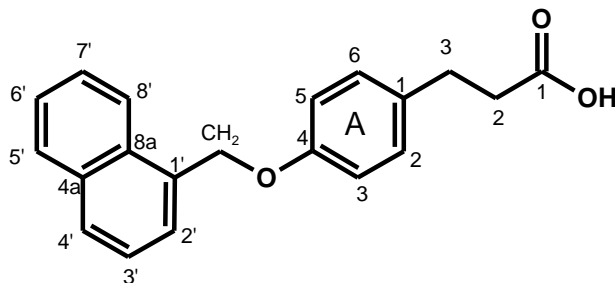
Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-5		
Posición	δ , mult, H, J	δ
	^1H	^{13}C
1	----	----
2	----	168.4
3 (NH)	12.52, s, 1H	----
4	----	167.9
5	----	126.4
CH	7.75, s, 1H	132.2
A		
1	----	126.6
2	7.55, d, 2H, 8.76	132.5
3	7.20, d, 2H, 8.82	116.1
4	----	154
5	7.20, d, 2H, 8.82	132.5
6	7.55, d, 2H, 8.76	116.1
CH ₂	5.22, s, 2H	70.9
B		
1	----	----
2	----	160.6
3	----	120.9
4	----	164.1
5	----	126.2
6	8.23, s, 1H	149.8
CH ₃	2.22, s, 3H	10.9
O-CH ₃	3.74, s, 3H	60.2
CH ₃ '	2.25, s, 3H	13.4

Tabla 13. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-6

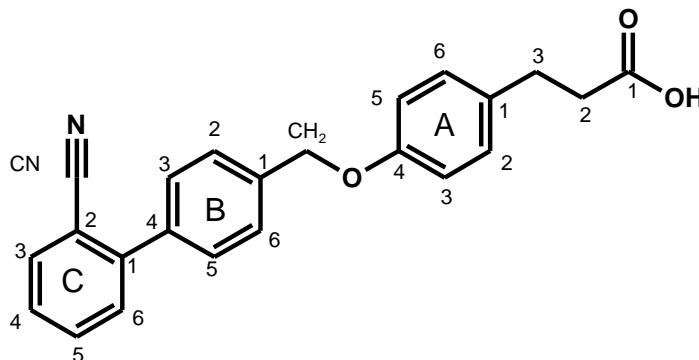
Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-6		
Posición	δ , mult, H, J	δ
	^1H	^{13}C
1	----	----
2	----	168.4
3 (NH)	12.52, s, 1H	----
4	-----	167.9
5	----	121.8
CH	7.75, s, 1H	132.2
A		
1	----	126.9
2	7.55, d, 1H, 8.7	132.5
3	7.19, d, 1H, 8.76	116.1
4	----	155.2
5	7.19, d, 1H, 8.76	116.1
6	7.55, d, 1H, 8.7	132.5
CH ₂	5.28, s, 2H	70.7
B		
1	----	----
2	----	160.5
3	----	120.9
4	-----	161.8
5	7.16, d, 1H, 5.76	108.2
6	8.36, d, 1H, 5.64	148.2
CH ₃	2.21, s, 3H	10.4
O-CH ₂ -CF ₃	4.92, c, 2H	65.4-64.7
CF ₃	----	126.2

Tabla 14. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-7

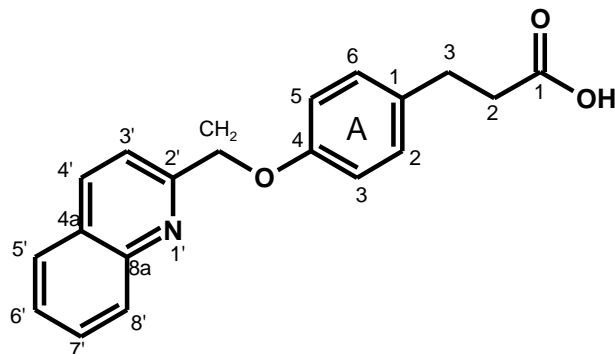
Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-7		
Posición	δ , mult, H, J	δ
	^1H	^{13}C
1	----	174.7
2	2.43, t, 2H	36.9
3	2.74, t, 2H	30.4
A		
1	----	134
2	7.14, d, 2H, $J_o=8.04$	129.7
3	6.94, d, 2H, $J_o=7.74$	115.1
4	----	157.0
5	6.94, d, 2H, $J_o=7.74$	115.1
6	7.14, d, 2H, $J_o=8.04$	129.7
CH ₂	5.13, s, 2H	69.6
B		
1	----	140.4
2	7.72, s, 1H	126.5
3	----	140.8
4	7.43, d, 1H, $J_o=7.2$	126.6
5	7.61, t, 1H, $J_o=7.56$	129.5
6	7.48–7.46, m, 3H	126.4
C		
1	----	138.5
2	7.66, d, 2H, $J_o=8.22$	127.1
3	7.48-7.46, m, 3H	129.4
4	7.4, t, 1H	128
5	7.48-7.46, m, 3H	129.4
6	7.66, d, 2H, $J_o=8.22$	127.1

Tabla 15. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-8

Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-8		
Posición	δ , mult, H, J	δ
	^1H	^{13}C
1	----	174.3
2	2.49, t, 2H	36.1
3	2.76, t, 2H	30.0
A		
1	----	133.1
2	7.16, d, 2H, $J_o=8.46$	129.7
3	7.0, d, 2H, $J_o=8.46$	115.1
4	----	157.2
5	7.0, d, 2H, $J_o=8.46$	115.1
6	7.16, d, 2H, $J_o=8.46$	129.7
CH ₂	5.50, s, 2H	68.2
Naftaleno		
1'	----	133.7
2'	7.66, d, 1H, 6.9	127.03
3'	7.51, t, 1H, $J_o=7.56$	125.8
4'	7.92, d, 1H, 8.52	129.0
4a	----	133.6
5'	7.97, d, 1H, 7.86	128.9
6'	7.58-7.55, m, 2H	126.4
7'	7.58-7.55, m, 2H	126.9
8'	8.08, d, 7.97	124.3
8a	---	131.6

Tabla 16. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-9

Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-9		
Posición	δ , mult, H, J	δ
	^1H	^{13}C
1	----	178.7
2	2.66, t, 2H	35.8
3	2.91, t, 2H	29.8
CH ₂	5.11, s, 2H	69.6
A		
1	----	
2	7.15, d, 2H, 8.46	129.3
3	6.93, d, 2H, 8.52	114.9
4	----	157.2
5	6.93, d, 2H, 8.52	114.9
6	7.15, d, 2H, 8.46	129.3
B		
1	----	137.8
2	7.58, 2H 8.16	129
3	7.55, 2H, 8.22	127.7
4	----	137.7
5	7.55, 2H, 8.22	127.7
6	7.58, 2H 8.16	129
C		
1	----	145.1
2	----	111.2
3	7.76, d, 1H, 7.74	133.8
4	7.44, t, 1H, 7.68	127.6
5	7.63, t, 1H, 7.62	132.8
6	7.51, d, 1H, 7.86	130.0
CN	----	118.6

Tabla 17. Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-10

Desplazamientos químicos obtenidos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto ACB-10		
Posición	δ , mult, H, J	δ
	^1H	^{13}C
1	----	174.2
2	2.49, t, 2H	35.9
3	2.74, t, 2H	29.9
OH	12.1, s, 1H	---
A		
1	----	133.8
2	7.15, d, 2H, 8.34	129.8
3	6.97, d, 2H, 8.82	115.1
4	----	156.9
5	6.97, d, 2H, 8.82	115.1
6	7.15, d, 2H, 8.34	129.8
CH ₂	5.33, s, 2H	71.2
Quinolina		
1'	----	----
2'	----	158.2
3'	7.66, d, 1H, 8.4	119.9
4'	8.02, d, 1H, 8.46	137.5
4a	----	128.4
5'	7.99, d, 1H, 8.16	130.3
6'	7.62, t, 1H, 7.8, 7.14	127.01
7'	7.79, t, 1H, 6.96, 8.34	129.0
8'	8.41, (d, 1H, H-8', $J_{o}=8.52$	
8a	----	147.4

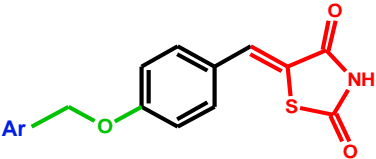
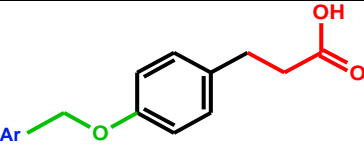
7.2 PARTE *IN SILICO*

7.2.1 PASS

Con la finalidad de predecir las posibles actividades de los compuestos diseñados sobre distintos blancos, se llevó a cabo la predicción de su actividad biológica con el programa computacional PASS. Los cálculos de PASS están basados en datos de relación estructura-actividad (SAR) de compuestos similares a los de prueba evaluados experimentalmente.

A continuación, se muestran las probabilidades de actividad biológica arrojadas mediante PASS, en las que se observa la probabilidad de actividad (Pa) e inactividad (Pi). Valores de $Pa > 0.7$ indican una buena probabilidad de mostrar actividad experimental, valores de Pa entre 0.5 y 0.7 indican una mediana probabilidad y valores de $Pa < 0.5$ indican baja probabilidad (mas no inactividad).

Tabla 18. Predicción de la actividad biológica con el programa PASS, de los compuestos **ACB-1-10**

Compuesto	Ar	Actividad					
		Antidiabético		Insulinosensibilizador		Insulino-promotor	
Compuesto	Ar	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi
ACB-1	3-Bifenil	0,767	0,005	0,419	0,004	----	----
ACB-2	1-Naftil	0,746	0,005	0,314	0,005	----	----
ACB-3	2-Quinolinil	0,719	0,005	0,346	0,004	----	----
ACB-4	2-Piridin	0,730	0,005	0,388	0,004	----	----
ACB-5	2-Pridin-3,5-CH ₃ : 4-OCH ₃	0,649	0,009	0,269	0,005	----	----
ACB-6	Piridin-3-CH ₃ , 4-OCH ₂ -CF ₃	0,708	0,006	0,295	0,005	----	----
Compuesto	Ar	 <p style="text-align: center;">Serie A</p>					
Compuesto	Ar	 <p style="text-align: center;">SERIE B</p>					
ACB-7	3-Bifenil	0,523	0,020	0,271	0,005	0,802	0,004
ACB-8	1-Naftil	0,471	0,028	0,228	0,008	0,774	0,004
ACB-9	4-Bifenil-2-carbonitrilo	0,477	0,027	0,214	0,009	0,730	0,005
ACB-10	2-Quinolinil	0,496	0,024	0,171	0,018	0,592	0,015
Saroglitazar	---	0,790	0,005	----	---	---	---
Pioglitazona		0,976	0,003	0,883	0,001	---	---
TAK-875		0,432	0,035	---	---	---	---

Con la finalidad de obtener resultados más certeros y de cierta forma validados, se decidió llevar a cabo las predicciones tanto de fármacos como moléculas en fases clínicas de cada uno de los blancos abordados en este proyecto. En primer lugar se realizó la predicción de Saroglitazar el cual es el único fármaco dual PPAR- α/γ disponible en el mercado en la India; por otro lado, se tomó como referencia a la Pioglitazona agonista PPAR- γ y la molécula **TAK-875** que es un agonista GPR40.

Para el caso de Saroglitazar la predicción mostró una alta probabilidad de tener actividad antidiabética; así mismo la Pioglitazona arrojó altas probabilidades de mostrar actividad antidiabética y altas probabilidades de insulinosensibilizador. En este contexto, es importante resaltar que las predicciones para estos dos fármacos se encuentran acorde a su actividad farmacológica así como a su mecanismo de acción.

Con respecto a **TAK-875** mostró bajas probabilidades como antidiabético. Cabe mencionar que esta molécula se encuentra en fases experimentales.

Con base en lo anterior, se puede inferir que las predicciones de actividad biológica a través de este programa (PASS) pueden ser de gran utilidad para la elección de nuevas moléculas bioactivas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en PASS, todos los compuestos mostraron de altas a discretas probabilidades de actividad antidiabética, así como insulinosensibilizadora. Por otro lado, únicamente los derivados del ácido fenilpropanoico (serie B) mostraron alta y mediana probabilidad de ser insulino-promotores. Esto probablemente debido a su similitud estructural con los agonistas GPR40, ya que este receptor está implicado en la liberación de insulina independiente de glucosa; por otro lado muchos de los agonistas reportados de este receptor contienen el fragmento del ácido fenilpropanoico (Tabla 6).¹⁰³

Es de suma importancia mencionar que los compuestos que resultaron con mejores predicciones de actividad biológica en este programa son: **ACB-1, ACB-4 ACB-7, ACB-8 y ACB-9.**

7.2.2 Evaluación *in silico* de los compuestos sintetizados, en el programa computacional ACD/Tox Suite

Un software utilizado para la evaluación *in silico* de los compuestos es el programa computacional ACD/Tox, el cual nos permite predecir algunos parámetros toxicológicos.

7.2.2.1 Inhibición de isoformas de CYP450

La biotransformación de los fármacos se lleva a cabo principalmente vía citocromo P450, catalizando la hidroxilación de estos para generar metabolitos más polares que se excreten con mayor facilidad. La inhibición hacia CYP450 por fármacos puede interferir con el metabolismo del mismo fármaco e incluso de otros, modificando la acción de éstos en el organismo. Por otro lado es bien conocido que el metabolismo de algunas moléculas, transforma compuestos pro carcinógenos en carcinógenos.¹⁰⁴

En este proyecto se determinó la probabilidad de inhibición hacia los principales CYP450 como CYP3A4, CYP2D6 y CYP1A2. Por otro lado, se determinó la inhibición de CYP2C19 y CYP2C9, los cuales representan un 20% de la actividad citocromo P450 del hígado. La inhibición se reporta a una concentración inhibitoria clínicamente relevante ($CI_{50} < 10\mu M$).

Para el CYP3A4 se mostraron medianas probabilidades de inhibición de los compuestos de tipo tiazolidindiona **ACB-1-6**, en donde los compuestos que contienen nitrógenos básicos en su estructura fueron los que manifestaron la mayor probabilidad de inhibición, ya que la presencia de núcleos básicos se detecta como alertas. Por otro lado, los compuestos **ACB-7-10** presentan bajas probabilidades de inhibición hacia esta isoforma, lo cual es muy importante ya que es la más abundante.

Con respecto a la isoforma CYP2D6 todos los compuestos presentaron baja probabilidad de inhibición. Para las isoformas CYP2C9, 2C19 los compuestos **ACB-1-10** revelaron bajas probabilidades de inhibirlos. Por otro lado, los compuestos **ACB-1-3** manifestaron una alta probabilidad de inhibición de CYP1A2; sin embargo, esta es una isoforma inducible por compuestos policíclicos aromáticos como el benzopireno un procarcinógeno, debido a que su metabolismo genera epóxidos formando aductos con el ADN y proteínas, los cuales son indicadores moleculares de riesgo de cáncer¹⁰⁵, por lo tanto su inhibición podría resultar favorable. El resto de los compuestos arrojaron de bajas a medias probabilidades de inhibición hacia todas las isoformas.

Adicionalmente se utilizó Clotrimazol inhibidor conocido de CYP450 como control positivo, mostrando una probabilidad de inhibición hacía distintas isoformas.

Tabla 19. Predicción de la inhibición de los CYP por los compuestos ACB-1-10

Concentración	Compuesto	Isoforma del citocromo				
		CYP3A4	CYP2D6	CYP2C9	CYP2C19	CYP1A2
		Probabilidad de inhibición				
Cl ₅₀ < 10µM	ACB-1	0.31	0.15	0.46	0.74	0.68
	ACB-2	0.26	0.07	0.38	0.28	0.76
	ACB-3	0.39	0.04	0.30	0.30	0.72
	ACB-4	0.32	0.03	0.22	0.18	0.44
	ACB-5	0.35	0.03	0.28	0.21	0.21
	ACB-6	0.49	0.06	0.26	0.21	0.18
	ACB-7	0.08	0.05	0.08	0.17	0.05
	ACB-8	0.07	0.05	0.14	0.15	0.20
	ACB-9	0.07	0.02	0.17	0.06	0.04
	ACB-10	0.10	0.03	0.06	0.15	0.09
	Pioglitazona	0.22	0.03	0.10	0.08	0.07
	TAK-875	0.19	0.01	0.15	0.11	0.00
	Clotrimazol	0.85	0.07	0.41	0.80	0.12

7.2.2.2 Bloqueo de canales hERG

La predicción del bloqueo de canales hERG ha surgido rápidamente como una herramienta útil en el descubrimiento de fármacos para identificar sustancias cardiotoxícas. hERG (human ether-a`-go-go-related gene) es un gen que codifica para un canal iónico de potasio presente en el músculo cardíaco. Si este canal está bloqueado, puede causar la prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma o también denominado síndrome QT largo, lo cual está asociado principalmente a arritmias y puede llegar a ser fatal.⁵²

En la Tabla 19 se muestran los resultados de la probabilidad de bloqueo de los canales hERG, en donde se observa que los derivados de tiazolidindiona presentan de 0.18 a 0.79 de probabilidad de ser bloqueadores es decir de bajas a altas probabilidades. Lo anterior, se puede atribuir a que los fármacos de tipo glitazona suelen ser bloqueadores de canales hERG tal es el caso de la Rosiglitazona que ha mostrado ser un bloqueador de estos canales esto se ha asociado a los efectos adversos a nivel cardiovascular; sin embargo fármacos como la Pioglitazona no muestran estos efectos cardiotoxícos.¹⁰⁶ Por otro lado, es

importante resaltar que existen otros parámetros que el programa toma en cuenta para que una molécula presente probabilidades de ser un bloqueador como la presencia de aminas básicas, ausencia de grupos ionizables, ausencia de aceptores de puente de hidrógeno y la lipofilicidad misma que se puede asociar con un $\log P > 3.7^{107}$, en este caso algunas de los compuestos derivados de tiazolidindiona **ACB-1-6** contienen grandes fragmentos lipófilicos y la presencia de piridinas básicas que el programa detecta como alertas; sin embargo es necesario corroborar esto mediante ensayos biológicos experimentales, ya que existen otros fármacos de tipo glitazona como la Pioglitazona que no son bloqueadores de los canales hERG y además muestran en esta predicción baja probabilidad de ser bloqueadores.

Con respecto a los derivados del ácido fenilpropanoico **ACB-7-10** revelaron baja probabilidad de bloqueo hacia los canales hERG, esto debido a la presencia del ácido carboxílico en su estructura, el cual se encuentra ionizado a pH fisiológico impidiendo su interacción con los residuos de aminoácidos de carácter ácido que se encuentran en los canales hERG. Así mismo la molécula **TAK-875** agonista GPR40 mostró bajas probabilidades de bloqueo de canales hERG.

Por otro lado con la finalidad de contar con un control positivo, se llevó a cabo la predicción de bloqueo de canales hERG con Terfenadina, un antihistamínico que ha manifestado efectos cardiotóxicos severos.⁷¹ Dado esto, Terfenadina reveló una probabilidad de bloqueo hacia estos canales de 0.98, siendo mucho mayor a la de los compuestos diseñados.

Tabla 20. Probabilidad de bloqueo de canales hERG de los compuestos ACB-1-10

Compuesto	Probabilidad
ACB-1	0.78
ACB-2	0.58
ACB-3	0.50
ACB-4	0.18
ACB-5	0.21
ACB-6	0.79
ACB-7	0.10
ACB-8	0.04
ACB-9	0.13
ACB-10	0.03
Saroglitazar	0.16
Pioglitazona	0.10
TAK-875	0.21
Terfenadina	0.98

7.2.2.3 Toxicidad aguda

La "toxicidad aguda" de una sustancia química se define como la dosis que es letal para el 50% de los animales tratados. La toxicidad aguda (DL_{50}) puede ser vista, como un "potencial acumulado" a causa de diversos efectos agudos y la muerte de los animales.

La toxicidad se determinó *in silico* mediante el programa ACD/Tox. Suite la DL_{50} (mg/kg) en ratones (vía de administración oral, intraperitoneal, intravenosa) y ratas (vía subcutánea e intraperitoneal) (Tabla 21).

La DL_{50} de los compuestos **ACB-1-6** resultó menor a la de los compuestos de referencia como el Saroglitazar, Pioglitazona y **TAK-875** y menor con respecto a la de los derivados del ácido fenilpropanoico **ACB-7-10**. Lo anterior se vio reflejado en la categoría de toxicidad de la OECD (Tabla 22) en la que se posicionaron los compuestos, ya que **ACB-1-6** caen dentro las categorías 3-4 que se clasifican como tóxicos y toxicidad moderada; sin embargo, la mayoría de los fármacos comercialmente disponibles se colocan en estas categorías. Mientras tanto los compuestos **ACB-7-10** y los compuestos de referencia están en las categorías 4-5 que corresponde a toxicidad moderada y sin peligro.

Tabla 21. DL_{50} (mg/kg) de los compuestos ACB-1-10

DL ₅₀ (mg/kg)							
Compuesto	Ratón intraperitoneal	Ratón oral	Ratón intravenoso	Ratón subcutáneo	Rata intraperitoneal	Rata oral	Categoría
ACB-1	320	1100	46	400	260	620	3-4
ACB-2	290	810	52	270	150	110	3-4
ACB-3	290	930	65	600	220	460	3-4
ACB-4	200	1200	72	490	360	430	3-4
ACB-5	160	1000	76	430	300	490	3-4
ACB-6	430	870	84	200	250	520	3-4
ACB-7	320	1400	170	770	560	3800	4-5
ACB-8	530	2000	280	1500	460	1700	4-5
ACB-9	580	990	89	1500	1200	4000	4-5
ACB-10	960	1700	250	2300	410	1700	4-5
ACB-11	280	2400	240	4000	830	1500	4-5
Saroglitazar	350	1400	110	440	290	1800	4-5
Pioglitazona	440	1900	110	200	400	1100	4-5
TAK-875	350	2400	120	550	170	1500	4

A continuación, en la Tabla 22 se muestra la clasificación de toxicidad por la OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). La cual consta de cinco categorías de acuerdo a los valores de DL_{50} .

Tabla 22. Clasificación de toxicidad por la OECD.

Categoría	Rango de DL_{50}	Clasificación
I	$< 5 \text{ mg/kg}$	Altamente Tóxica
II	$5 \leq DL_{50} \leq 50 \text{ mg/kg}$	Muy tóxica
III	$50 \leq DL_{50} \leq 300 \text{ mg/kg}$	Toxica
IV	$300 \leq DL_{50} \leq 2000 \text{ mg/kg}$	Toxicidad Moderada
V	$DL_{50} > 2000 \text{ mg/kg}$	Sin peligro

7.2.3 admetSAR

La absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad juegan un papel muy importante en el desarrollo y descubrimiento de fármacos. Esta información es especialmente útil cuando se realiza una evaluación de riesgos en humanos incluso ambientales.

Para este trabajo se predijeron los siguientes parámetros: absorción intestinal humana, permeabilidad sobre células Caco-2, probabilidad de sustrato de la glicoproteína P, sustrato de los CYP 450 3A4, toxicidad de Ames (genototoxicidad), carcinogénesis, y toxicidad en abejas. Dichos parámetros son calculados por la comparación de la molécula de interés con otras que se encuentran en una base de datos con resultados experimentales.

Los resultados obtenidos de los compuestos **ACB-1-10** muestran que tienen una alta probabilidad de absorción intestinal. Además manifestaron de mediana a alta probabilidad de permeabilidad en células Caco-2, estas células son muy utilizadas como modelo de distintos tipos de transporte de fármacos debido a que poseen características bioquímicas y morfológicas similares a los enterocitos¹¹⁰. Por otro lado se observaron buenas y medianas probabilidades de no ser sustratos de la glicoproteína P, un transportador de eflujo que a menudo se relaciona con resistencia a fármacos.

Con respecto al metabolismo, los compuestos mostraron medianas a altas probabilidades de no ser sustratos de CYP3A4 (isoforma más abundante), lo anterior corresponde con la literatura, ya que por un lado moléculas de tipo tiazolidindiona son mayormente metabolizadas por la isoforma CYP2C8^{111, 73} y los ácidos carboxílicos por CYP2C9.¹¹²

Por otro lado los compuestos **ACB-1-10** mostraron de media a alta probabilidad de no ser tóxicos en la prueba de AMES. Así como probabilidades altas de no ser carcinogénicos.

Adicionalmente se predijo la toxicidad de los compuestos **ACB-1-10** en abejas melíferas, los resultados mostraron probabilidades medias y altas de no ser tóxicos en estos organismos, lo anterior es de suma importancia ya que son los principales polinizadores y en los últimos años se ha visto un decremento en su población.

En la Tabla 23 se muestran las predicciones de admetSAR para los compuestos **ACB-1-10**.

Tabla 23. Propiedades ADMET del compuesto **ACB-1-10**

Modelo	Resultado	Probabilidad									
		ACB-1	ACB-2	ACB-3	ACB-4	ACB-5	ACB-6	ACB-7	ACB-8	ACB-9	ACB-10
Absorción											
Absorción en intestino humano		1	1	1	0.99	0.97	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99
Permeabilidad Caco-2		0.51	0.52	0.57	0.55	0.52	0.54	0.72	0.74	0.66	0.57
No sustrato de glicoproteína P		0.76	0.70	0.63	0.69	0.56	0.50	0.66	0.57	0.74	0.53
Metabolismo											
CYP450 3A4 no sustrato		0.57	0.54	0.52	0.57	0.6	0.53	0.63	0.59	0.59	0.57
Toxicidad											
No tóxico AMES		0.62	0.53	0.62	0.66	0.64	0.65	0.95	0.88	0.94	0.93
No carcinogénico		0.85	0.90	0.92	0.91	0.91	0.87	0.89	0.94	0.91	0.98
Toxicidad en abejas melíferas		0.61	0.73	0.56	0.53	0.51	0.67	0.73	0.81	0.65	0.54

7.2.4 DIA-DB

DIA-DB es un servidor web que contiene información acerca de la actividad de compuestos antidiabéticos conocidos, así como de moléculas en fase experimental. Este permite la predicción de moléculas con potencial efecto antidiabético a través de su similitud estructural, así como un Docking inverso. Por lo tanto, es una herramienta útil para el diseño de fármacos y compuestos bioactivos. Es importante mencionar que los compuestos **ACB-1-10** fueron diseñados para distintas dianas implicadas en la diabetes mellitus 2, las cuales poseen un patrón farmacofórico similar (farmacoforo unificado). Por lo tanto, resulta interesante conocer la posible afinidad hacia estos blancos.

El acoplamiento molecular inverso arrojó 18 blancos moleculares a los cuales podrían ser afines los compuestos **ACB-1-10**. En donde se hizo énfasis en: PPAR- γ , la enzima aldosa reductasa, GPR40, PPAR- α y PTP debido a que estos fueron las dianas moleculares planteadas en el proyecto.

En la Tabla 24 se muestran los puntajes obtenidos para los blancos moleculares abordados en éste proyecto. Para el caso de la enzima aldosa reductasa los compuestos **ACB-1-10** arrojaron los mejores puntajes no sólo con respecto a los blancos planteados, sino al total de los obtenidos mediante DIA-DB. Por tal motivo, se decidió probar todos los compuestos frente a esta enzima. Con respecto a PPAR- γ GPR40, PPAR- α y la PTP los compuestos **ACB-1-3** y **ACB-6-9** resultaron tener los mejores puntajes, por lo que se prevé que manifiesten buena afinidad hacia estos blancos.

Tabla 24. Blancos moleculares obtenidos mediante DIA-DB

Compuesto	Blanco molecular				
	Aldosa reductasa	PPAR- γ	GPR40	PPAR- α	PTP
	Afinidad (kcal/mol)				
ACB-1	-13.4	-11	-10.6	8.9	-8.2
ACB-2	-13.3	-10.7	-11.3	9.3	-8.8
ACB-3	-13.6	-11.1	-10.3	-8.5	-8
ACB-4	-11	-8.9	-9.3	-7.6	-7.4
ACB-5	-11.3	-9.2	-9.5	-8	-7.4
ACB-6	-10.4	-10	-9	-8.1	-7.9
ACB-7	-11.9	-9.6	-10.3	-8.6	-7.8
ACB-8	-11.3	-9.4	-10.6	-8.4	-7.8
ACB-9	-11.7	-9.6	-9.8	-7.9	-7.5
ACB-10	-11.4	-9.4	-9.9	-8.1	-7.5

Una vez realizadas las evaluaciones *in silico*, se llevó a cabo un análisis de consenso farmacológico para la selección de un líder seguro (safe lead).

El análisis de consenso farmacológico combina los resultados de los ensayos *in silico* como: predicciones farmacodinámicas (PASS, DIA-DB) y predicciones toxicológicas (ACD/ToxSuite, admetSAR). Este análisis se basa en la premisa de que cuanto más cálculos coinciden en que un compuesto es activo, con baja toxicidad y perfil farmacocinético adecuado, más confiable es la selección/discriminación de dicho compuesto bioactivo (para sintetizarlo y que muestre un comportamiento farmacológico adecuado). Por lo tanto, un compuesto que tiene puntuaciones altas de una colección de predicciones farmacológicas múltiples, es más

probable que sea un buen inhibidor / agonista / antagonista en un ensayo biológico que un compuesto que tiene una puntuación alta de solo una predicción única.

Una vez realizado el análisis de consenso farmacológico de los resultados de las predicciones *in silico* (PASS, ACD/Tox.Suite, admetSAR, DIA-DB) se eligió a compuestos con puntajes buenos, medios y bajos para priorizar los ensayos farmacológicos *in vitro* e *in vivo*, esto con la finalidad de validar el análisis de consenso farmacológico a través de estas herramientas. Cabe mencionar que la elección también fue llevada a cabo a través de criterios químico-farmacéuticos; así como de estudios previos en nuestro grupo de trabajo. Finalmente se eligió a los compuestos **ACB-1**, **ACB-4**, **ACB-7-9**.

7.3 PARTE *IN VITRO*

7.3.1 Prueba de funcionalidad celular MTT

Los ensayos de funcionalidad celular se basan en el uso de MTT un compuesto que al ser reducido da como producto al formazan que es colorido. Este ensayo es una técnica colorimétrica que es ampliamente utilizada para medir supervivencia y proliferación celular, relacionándose con la actividad de enzimas deshidrogenasas en las células como la succinato deshidrogenasa.

Con el objetivo de seleccionar una concentración adecuada para llevar a cabo algunos experimentos, se realizó un ensayo de funcionalidad celular, en donde se tomó en cuenta la concentración en la que la funcionalidad fuera >80%. La concentración seleccionada fue de 100 μ M. Los resultados expresados como porcentaje de funcionalidad se muestran en la Figura 40 y la Tabla 25.

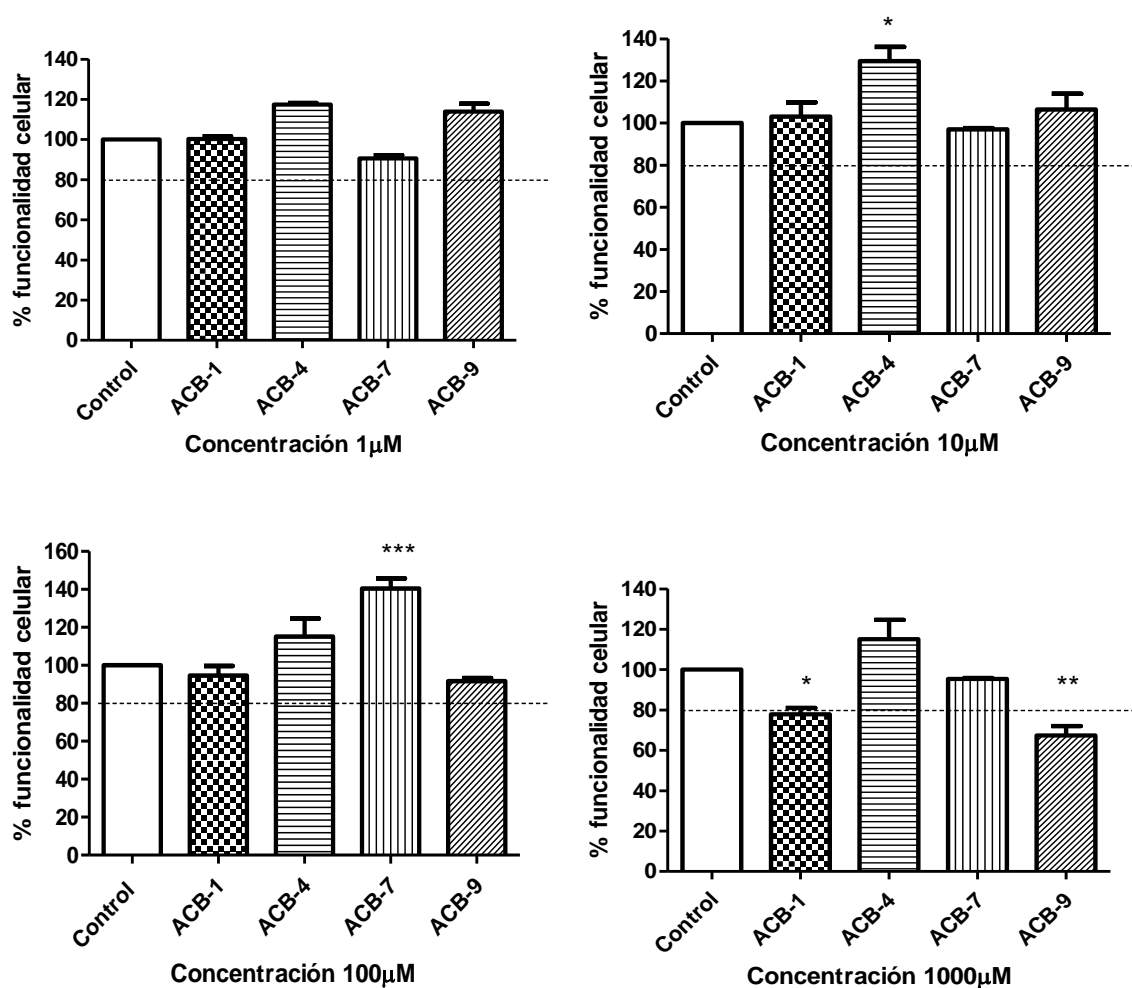


Figura 40. Gráficas de porcentaje de funcionalidad celular de los compuestos **ACB-1**, **ACB-4**, **ACB-7** y **ACB-9** a diferentes concentraciones: 1, 10, 100 y 1000 μM. Los resultados corresponden a la media ±EEM, n=2.

Tabla 25. Porcentajes de funcionalidad de la línea celular 3T3-L1 con los compuestos de prueba (**ACB-1**, **ACB-4**, **ACB-7** y **ACB-9**) a 1, 10, 100, 1000 μM.

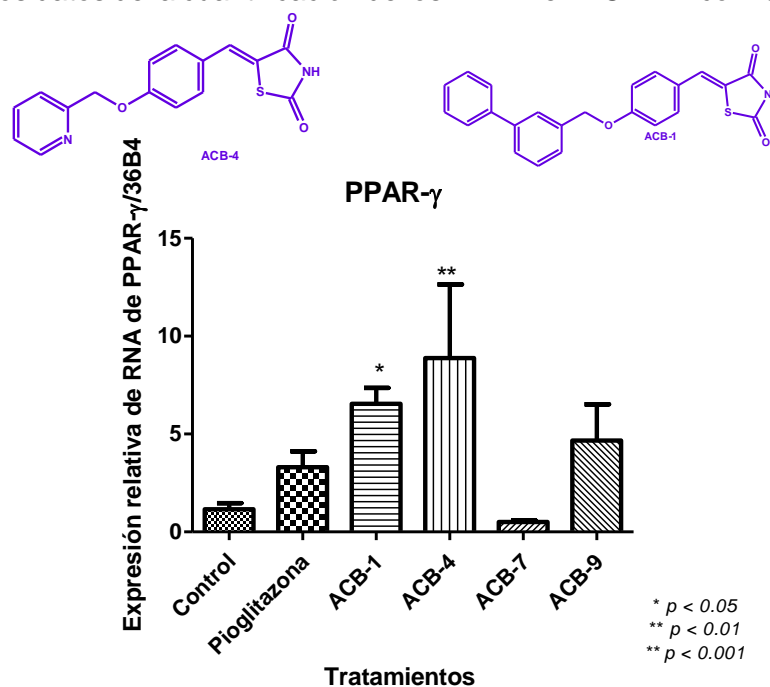
Concentración (μM)	ACB-1	ACB-4	ACB-7	ACB-9
1	100.21	117.44	90.56	113.96
10	103.08	129.44	96.99	106.48
100	94.64	115.09	140.40	91.69
1000	77.85	83.34	95.43	67.33

ANOVA de una vía. p>0.05 (n=2).

De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que ninguno de los compuestos de prueba a la concentración seleccionada (100 μ M).

7.3.2 Ensayo *in vitro* sobre la expresión relativa de PPAR- γ y GLUT4

Una vez realizados los ensayos de funcionalidad celular, se determinó *in vitro* el efecto de los compuestos **ACB-1**, **ACB-4**, **ACB-7** y **ACB-9** sobre PPAR- α/γ así como sobre su producto de activación GLUT-4. Para este ensayo se utilizaron adipocitos los cuales fueron sometidos a tratamiento con los compuestos durante 24 h. La expresión relativa se obtuvo a partir de los datos de la cuantificación de los RNAm en PCR-RT con respecto al gen 36B4.



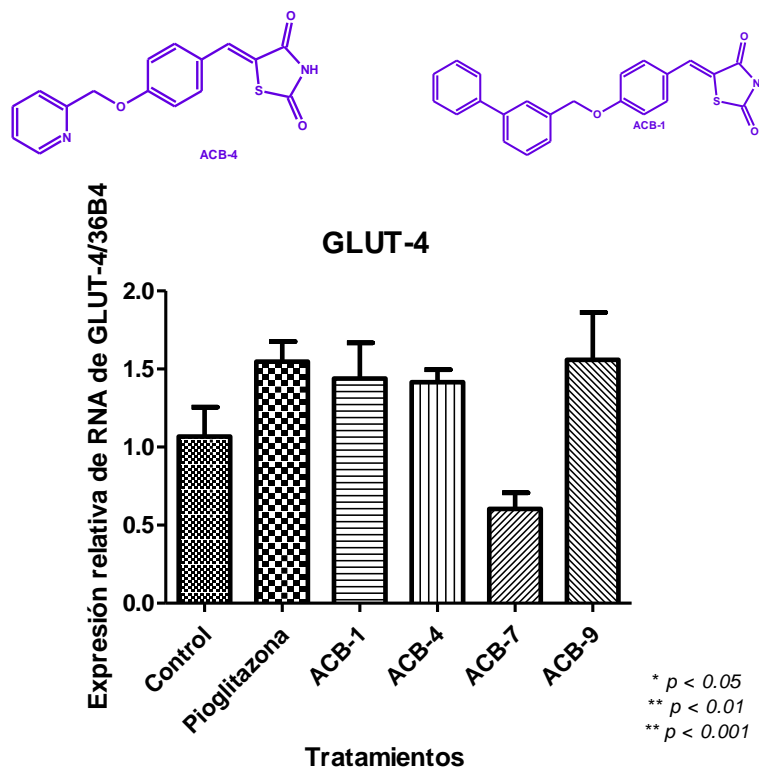
Gráfica 1. Efecto de los compuestos **ACB-1**, **ACB-4**, **ACB-7**, y **ACB-9** sobre la expresión de RNAm de GLUT-4. Los resultados son el promedio \pm E.E.M ($n=3$). *Diferencia significativa con respecto al control.

En la Gráfica 1 se muestran los resultados de la expresión relativa sobre PPAR- γ . En donde se observa que los compuestos **ACB-1**, **ACB-4**, **ACB-9** incrementaron la expresión relativa de este receptor 6.5, 8.8 y x veces respectivamente. Por otro lado se observó únicamente un aumento de hasta 1.4 veces en la expresión relativa de GLUT-4 (Gráfica 2).

Los resultados obtenidos sugieren que a mayor nivel de expresión de PPAR- γ se observa una menor expresión de GLUT-4. De acuerdo a la literatura este fenómeno puede estar dado por la regulación de algunos miRNA sobre PPAR- γ . Tal es el caso de miR 222 el cual se ha demostrado que se encuentra elevado en el tejido adiposo de pacientes diabéticos y roedores, actuando como regulador negativo en la sensibilidad a la insulina a través de la

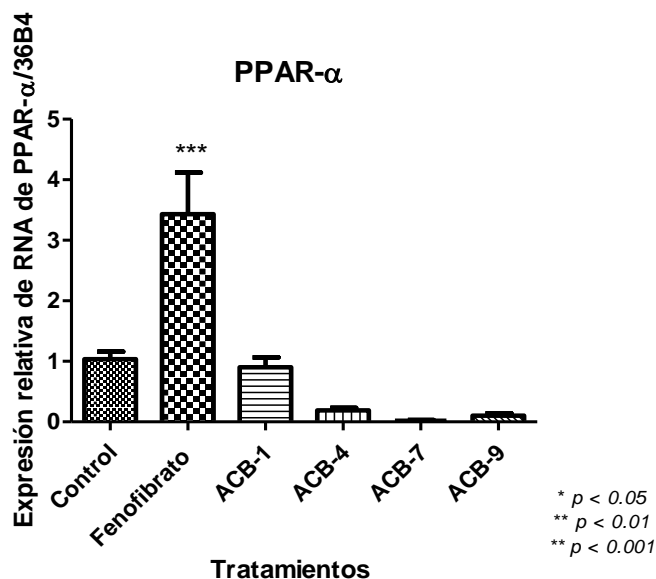
represión de la expresión de GLUT-4, por lo tanto aunque haya niveles elevados de PPAR- γ GLUT-4 no se expresa.¹¹³

Sin embargo la acción de PPAR- γ suele ir a través de diversas vías para la disminución de la glucemia.

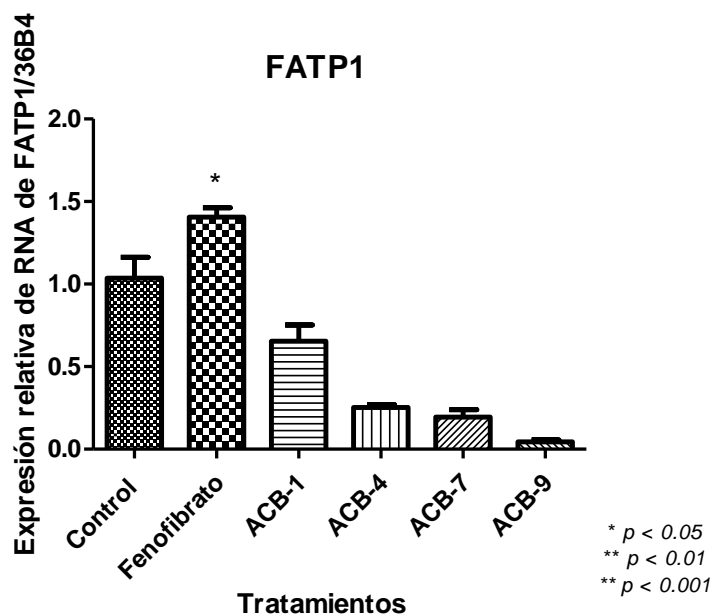


Gráfica 2. Efecto de los compuestos **ACB-1**, **ACB-4**, **ACB-7**, y **ACB-9** sobre la expresión de RNAm de GLUT-4. Los resultados son el promedio \pm E.E.M (n=3). *Diferencia significativa con respecto al control.

Con respecto a PPAR- α y FATP-1 ninguno de los compuestos ensayados **ACB-1**, **ACB-4**, **ACB-7** y **ACB-9** mostró un incremento en la expresión de estos blancos. Lo anterior podría atribuirse a que la cavidad del sitio activo de PPAR- α es más pequeña que la de PPAR- γ y los compuestos evaluados contienen en su estructura sustituyentes voluminosos, impidiendo así que estos interactúen de manera adecuada con el receptor.¹²



Gráfica 3. Efecto de los compuestos **ACB-1**, **ACB-4**, **ACB-7**, y **ACB-9** sobre la expresión de RNAm de PPAR-α. Los resultados son el promedio \pm E.E.M ($n=3$). *Diferencia significativa con respecto al control.

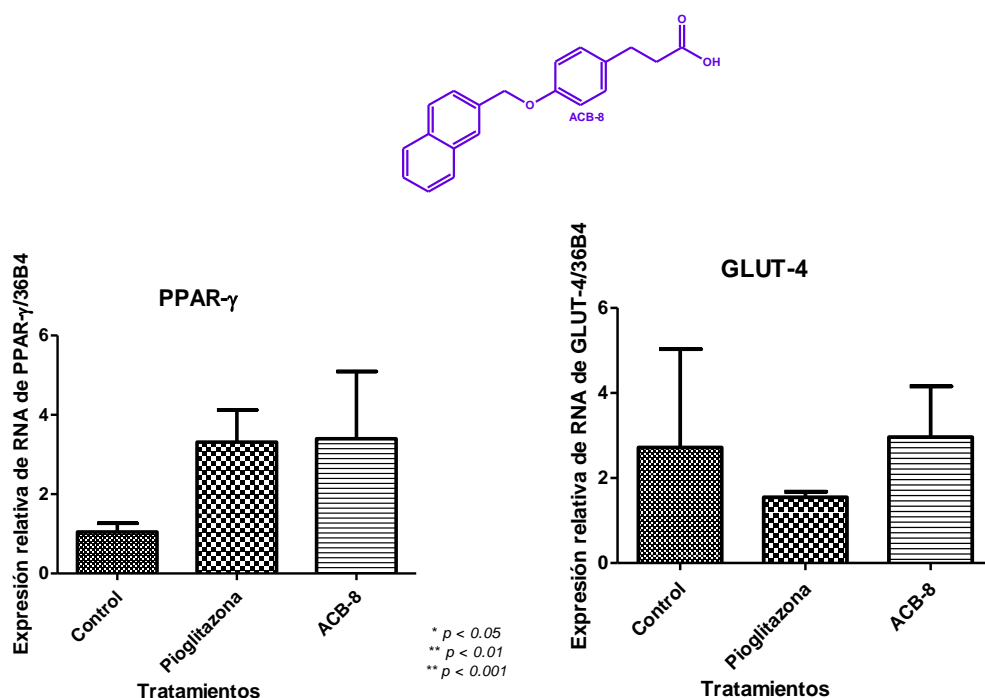


Gráfica 4. Efecto de los compuestos **ACB-1**, **ACB-4**, **ACB-7**, y **ACB-9** sobre la expresión de RNAm de FATP1. Los resultados son el promedio \pm E.E.M ($n=3$). *Diferencia significativa con respecto al control.

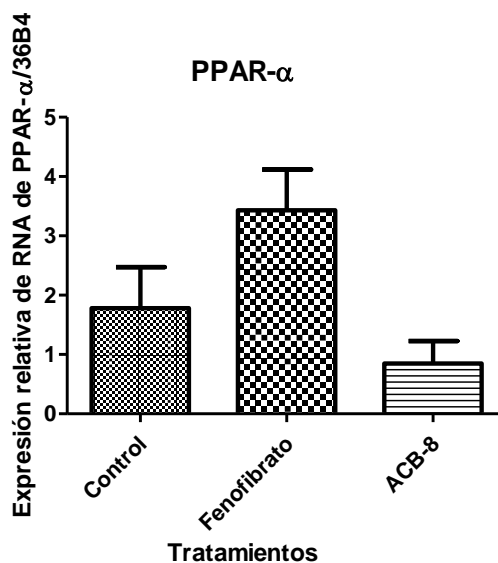
Con la finalidad de probar la capacidad multitarget de los compuestos sintetizados, se decidió probar al compuesto **ACB-8** sobre los receptores PPAR- α/γ y sus productos de activación GLUT-4 y FATP-1, ya que mostró buena actividad sobre el receptor GPR40 en células HEK-293 con una CE_{50} de $0.648 \pm 0.1 \mu\text{M}$.

En la Gráfica 5 se muestran los resultados de la expresión relativa sobre PPAR- γ y GLUT-4. En donde el compuesto **ACB-8** muestra un incremento de 3.4 veces la expresión relativa de este receptor siendo similar al de Pioglitazona; así como la consecuente expresión GLUT-4 (Gráfica 5). Sin embargo estos incrementos no resultaron ser significativos con respecto al control.

Por otro lado, el compuesto **ACB-8** no manifestó actividad sobre PPAR- α (Gráfica 6), por tal motivo se decidió no llevar a cabo los ensayos sobre su producto de activación FATP-1. Estos resultados concuerdan con los de las moléculas ensayadas anteriormente **ACB-1**, **ACB-4**, **ACB-7** y **ACB-9** ya que el compuesto **ACB-8** también presenta sustituyentes voluminosos, a lo cual se atribuye la inactividad sobre este target.



Gráfica 5. Efecto del compuesto ACB-8 sobre la expresión de RNAm de PPAR- γ /GLUT-4. Los resultados son el promedio \pm E.E.M (n=3). *Diferencia significativa con respecto al control.



Gráfica 6. Efecto del compuesto **ACB-8** sobre la expresión de RNAm de PPAR- α . Los resultados son el promedio \pm E.E.M ($n=3$). *Diferencia significativa con respecto al control.

A continuación se muestran los resultados del ensayo de inhibición enzimática de aldosa reductasa.

Para el ensayo de inhibición de la enzima aldosa reductasa, se tomaron en cuenta todos los compuestos sintetizados **ACB-1-10**, con base en los resultados obtenidos mediante el servidor web DIA-DB, ya que para todos los compuestos fue el blanco molecular que mostró el mejor puntaje.

7.3.3 Inhibición de la enzima aldosa reductasa

Serie A

Los ensayos in vitro iniciales sobre la enzima aldosa reductasa se llevaron a cabo utilizando enzima purificada de lentes oculares bovinos y con D, L-gliceraldehído (D, L-GAL) como sustratos.

En donde los compuestos de tipo tiazolidindiona **ACB-1** y **ACB-3** presentaron un porcentaje de inhibición bajo de 2 y 10% respectivamente.

El compuesto **ACB-4** reveló una baja inhibición de la enzima aldosa reductasa. Por otro lado, el compuesto **ACB-5** mostró una Cl_{50} de 11.2 μ M y el compuesto **ACB-6** una Cl_{50} de 1.9 μ M siendo este el más activo de la serie A y B. Cabe destacar que los compuestos **ACB-4-6** contienen el fragmento de posición 4 (OCH_2-CF_3) del compuesto **ACB-6** y el

metoxilo de la posición 5 del compuesto **ACB-5** (O-CH₃). Por otro lado, es importante mencionar que compuestos con actividad inhibitoria conocida sobre la enzima aldosa reductasa contienen estos fragmentos, los cuales participan en las interacciones con aminoácidos del sitio activo (Figura 41 Lidorestat, Tolrestat, Zopolrestat). piridina y en el caso particular de los compuestos **ACB-5** y **ACB-6** están sustituidos en las posiciones 3, 4 y 5 de este mismo anillo.

Con base en lo anterior, se infiere que dicha sustitución es necesaria para la actividad inhibitoria sobre aldosa reductasa, en específico el sustituyente trifluoroetoxilo de la

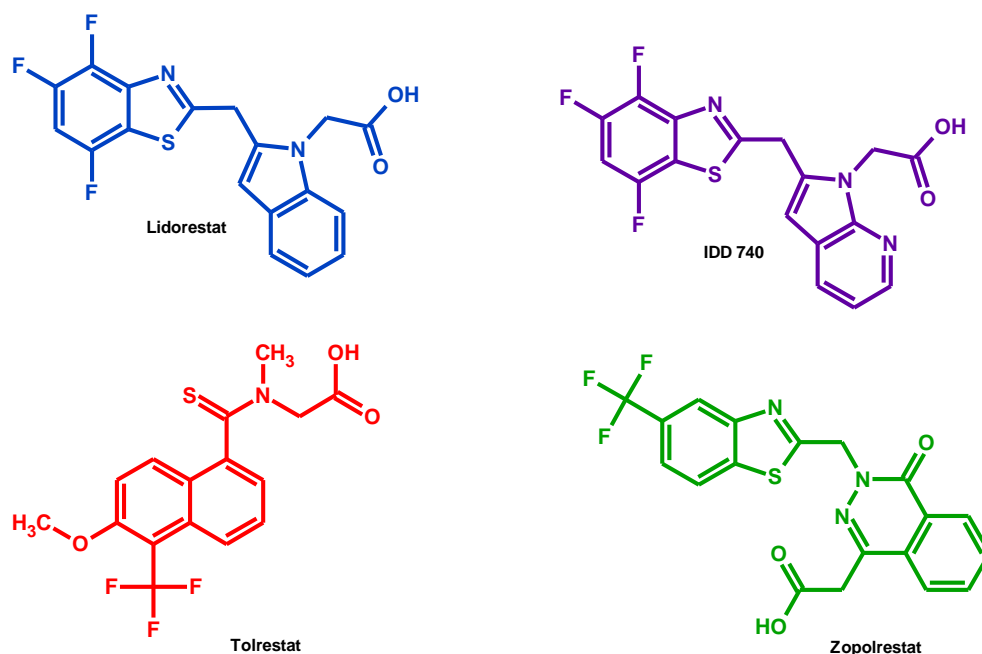


Figura 41. Fármacos inhibidores de aldosa reductasa.

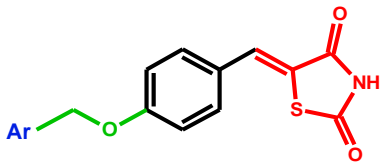
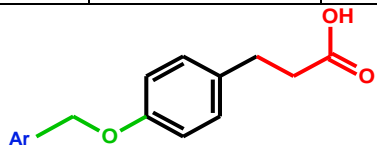
Serie B

Los compuestos **ACB-7-10** mostraron un buen efecto inhibitorio con CI_{50} que va de 30.2 a 7.4 μ M. Es importante señalar que estas moléculas **ACB-7-10** son ácidos carboxílicos (bioisómeros de tiazolidindiona) como la mayoría de los compuestos inhibidores de aldosa reductasa. De acuerdo a la literatura este fragmento es necesario para la actividad inhibitoria, ya que los ácidos carboxílicos tienen la capacidad de formar puentes de hidrógeno, mismo que podría reforzar la interacción de los compuestos con su posible sitio blanco. Cabe destacar que el compuesto **ACB-7** con el sustituyente 3-bifenil en la porción aromática presentó la mejor CI_{50} para esta serie.

De acuerdo a lo anterior, los compuestos **ACB-6** y **ACB-7** resultan buenos candidatos para su posterior evaluación biológica, ya que presentaron una $CI_{50} < 10\mu M$ considerándose como Hits experimentales.

Dado que los compuestos **ACB-5-10** manifestaron una buena CI_{50} frente a la enzima aldosa reductasa se probó su actividad inhibitoria utilizando diferentes sustratos L-idosa y 4-hidroxinonanal (HNE). En la Tabla 26 se muestran las CI_{50} obtenidas, las cuales revelan que los compuestos no son selectivos entre estos sustratos.

Tabla 26. CI_{50} sobre la enzima aldosa reductasa

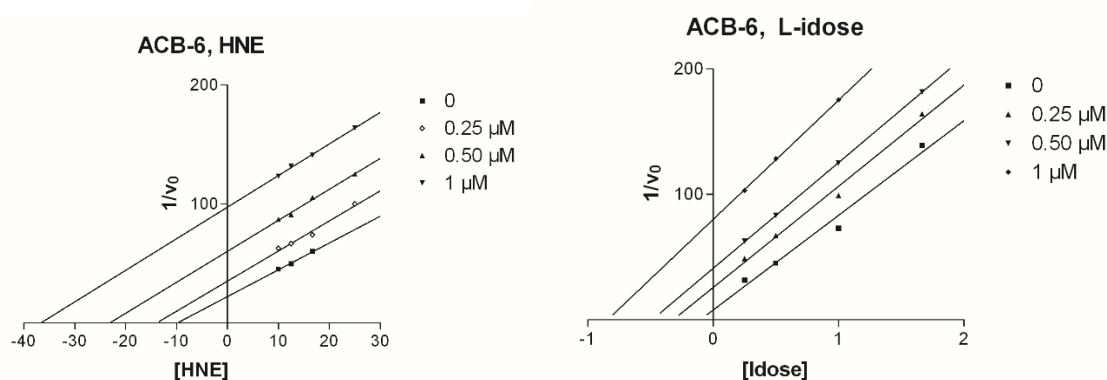
Inhibición aldosa reductasa				
Compuesto	Ar	CI_{50} D,L- GAL	CI_{50} L- idosa	CI_{50} HNE
 <p>SERIE A</p>				
ACB-1	3-Bifenil	2%	ND	ND
ACB-2	1-Naftil	ND	ND	ND
ACB-3	2-Quinolinil	10%	ND	ND
ACB-4	2-Piridin	12%	ND	ND
ACB-5	2-Pridin-3,5-CH ₃ : 4-OCH ₃	11.2 μM	5.1 μM	6.7 μM
ACB-6	Piridin-3-CH ₃ , 4- OCH ₂ -CF ₃	1.9 μM	1.7 μM	0.7 μM
 <p>SERIE B</p>				
ACB-7	3-Bifenil	7.4 μM	58.8 μM	32 μM
ACB-8	1-Naftil	17.9 μM	47.0 μM	62.9 μM
ACB-9	4-Bifenil-2- carbonitrilo	21.7 μM	57.2 μM	54.4 μM
ACB-10	2-Quinolinil	30.2 μM	59.6 μM	47.3 μM
Sorbinil	----	1.2 μM	----	----

*% inhibición a 100 μM , ND= no determinado. Intervalo de confianza 95%.

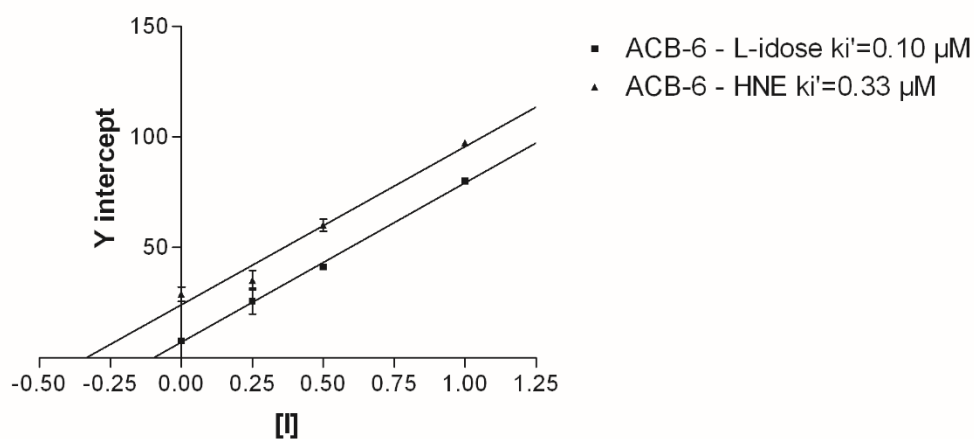
Posteriormente se llevó a cabo un análisis de la cinética de los compuestos **ACB-6** y **ACB-7**.

La Gráfica 7 de dobles recíprocos fue obtenida a diferentes concentraciones de **ACB-6** usando como sustrato a la L-idosa y 4-hidroxinonenal. En la Gráfica 7 se observa que las líneas nunca se interceptan, lo anterior sugiere que **ACB-6** muestra un comportamiento de un inhibidor acompetitivo tanto con L-idosa como con 4-hidroxinonenal. En la inhibición acompetitiva, el inhibidor se une directamente al complejo enzima-sustrato (ES) pero no a la enzima libre (E). Este tipo de inhibidores causa cambios conformacionales en el sitio catalítico de la enzima haciendo que el complejo ESI sea catalíticamente inactivo.

Posteriormente mediante el Gráfico 8 de Dixon se obtuvieron las constantes de inhibición (k_i') del compuesto **ACB-6** para L-idosa y 4-hidroxinonenal siendo estas de 0.10 y 0.33 μM respectivamente.

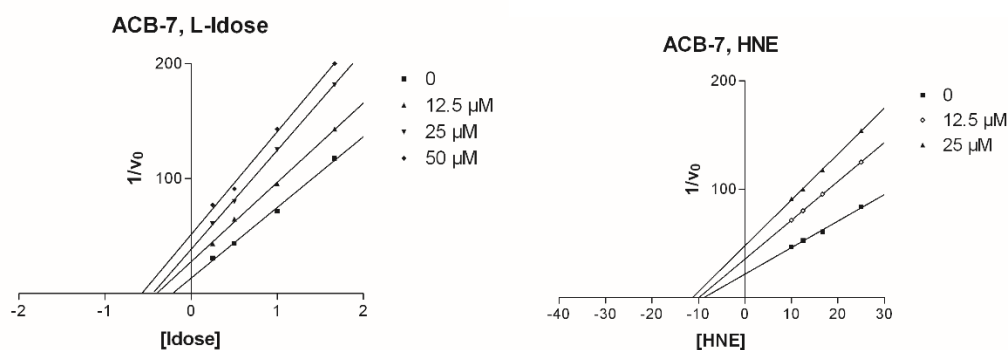


Gráfica 7. Método de dobles recíprocos (Lineweaver-Burk) para determinar el mecanismo cinético de inhibición del compuesto **ACB-6**.



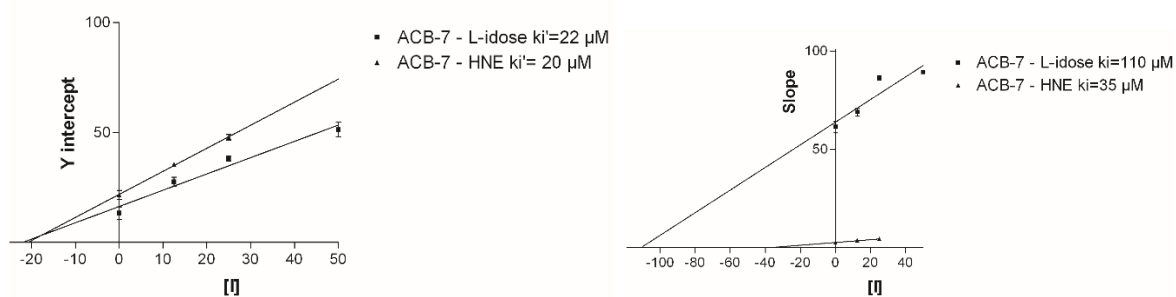
Gráfica 8. Gráfica de Dixon $1/v$ vs las distintas concentraciones de L-idosa y HNE para obtener el valor de k_i' del compuesto **ACB-6**.

La Gráfica 9 de dobles recíprocos fue obtenida a diferentes concentraciones de **ACB-7** usando como sustrato a la L-idosa y 4-hidroxi-nonal. En la Gráfica 9 se observa que las líneas se interceptan mutuamente, lo anterior sugiere que el compuesto **ACB-7** muestra un comportamiento de un inhibidor mixto tanto con L-idosa como con 4-hidroxi-nonal. Los inhibidores de tipo mixto se pueden unir tanto a la E como al complejo ES, formando los complejos EI y ESI los cuales impiden la catálisis de la enzima.



Gráfica 9. Método de dobles recíprocos (Lineweaver-Burk) para determinar el mecanismo cinético de inhibición del compuesto **ACB-7**.

Dado que los inhibidores mixtos pueden unirse tanto a E como ES, sus afinidades por estos dos complejos son distintas ($K_i \neq K_i'$). El cálculo de estas k_i (afinidad por E) y k_i' (afinidad por ES) del compuesto **ACB-7** para L-idosa y 4-hidroxi-nonal, se obtuvieron mediante las gráficas secundarias del intercepto Y (A) y la pendiente (B).



Gráfica 10. A) gráfica de Dixon $1/v$ vs las distintas concentraciones del inhibidor para la determinación de k_i' (afinidad por ES). B) gráfica de la pendiente vs la concentración del inhibidor para determinar la k_i (afinidad por E) **ACB-7**

De acuerdo a la evaluación de las constantes de inhibición se confirma que los compuestos **ACB-6** y **ACB-7** no son selectivos para los sustratos ensayados.

Para el compuesto **ACB-6** los valores de k_i' para la inhibición acompetitiva de 0.33 para HNE y 0.1 μM para L-idosa son muy cercanos y por lo tanto no se les puede atribuir

selectividad. Con respecto a **ACB-7** los bajos valores obtenidos de las constantes de inhibición, mismas que representan una inhibición de tipo mixto resultaron similares para ambas reacciones. Por otro lado, el compuesto **ACB-7** presenta poca afinidad hacia la enzima libre ($k_i = 110 \mu\text{M}$) cuando se tiene L-idosa como sustrato y no así con HNE ($k_i = 35 \mu\text{M}$). Esta diferencia puede atribuirse a la alta eficiencia de la enzima para reconocer la forma abierta del aldehído HNE ($k_i 3.5 \mu\text{M}$), esta molécula es más estable en su forma abierta ya que a pesar de que puede ciclarse al hacerlo forma un anillo de cinco miembros que es menos estable que el de seis miembros (L-idosa) debido a la tensión angular que existe en el ciclo.

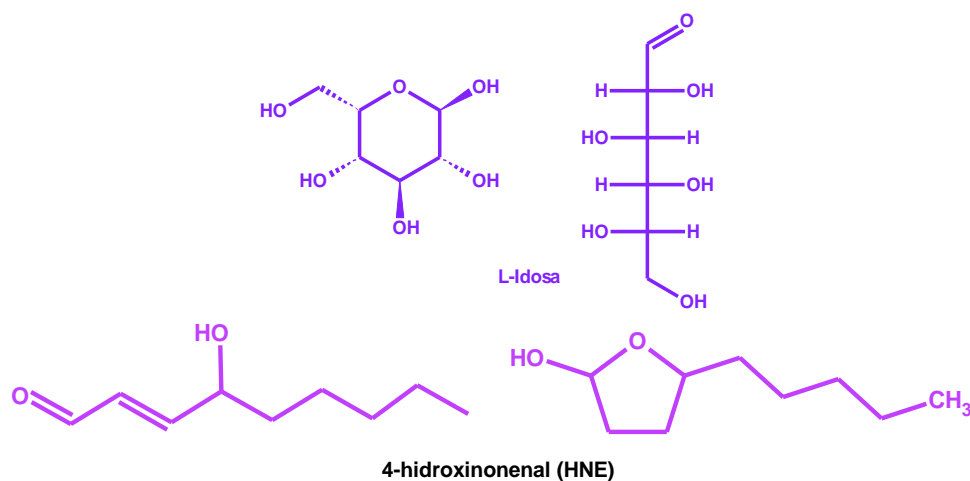


Figura 42. Comparación estructural de L-idosa y 4-hidroxinonenal (HNE) en su forma abierta y cíclica.

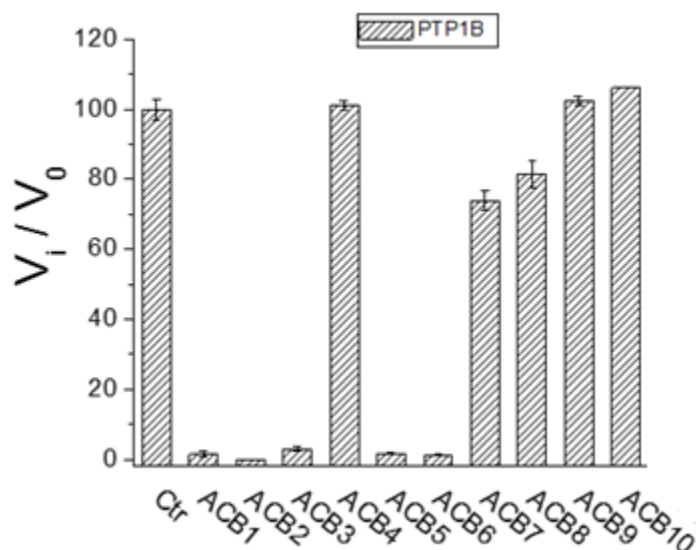
Con base en el valor de las k_i así como de CI_{50} se puede concluir que el compuesto **ACB-6** fue el que presentó la mejor actividad inhibitoria sobre la enzima aldosa reductasa.

A continuación se muestran los resultados de la inhibición enzimática sobre la enzima PTP1B. Con base en los resultados arrojados en el Docking inverso por el servidor DIA DB, así como la similitud estructural de estos con algunos inhibidores de la enzima PTP1B, se decidió evaluar a los compuestos **ACB-1-10** sobre éste blanco.

7.3.4 Ensayo de inhibición de la enzima proteína fosfatasa de tirosina 1B (PTP1B)

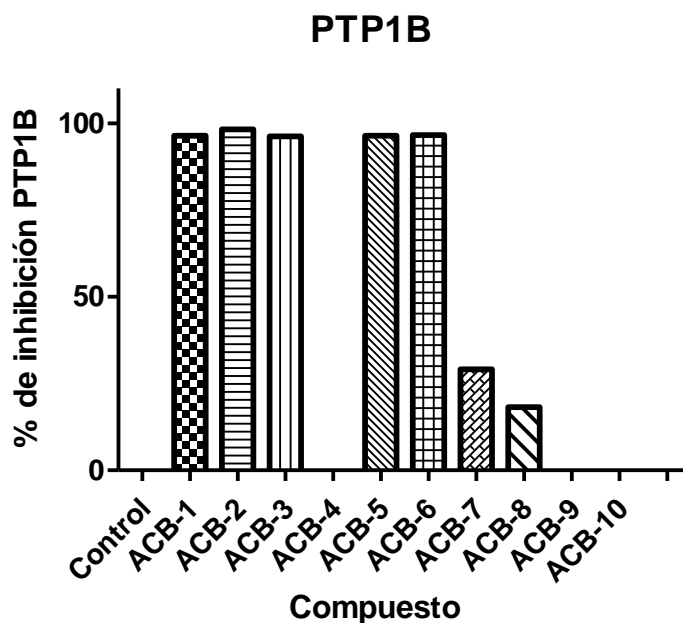
Para estudiar la actividad inhibitoria de los compuestos sobre la enzima PTP1B se llevó a cabo un análisis preliminar con una concentración fija de inhibidor $50 \mu\text{M}$ (*p*-nitrofenil fosfato).

En la Gráfica 11 se muestra la actividad residual de la enzima PTP1B frente a los compuestos **ACB-1-10**.



Gráfica 11. La actividad residual está expresada en porcentaje (%) y está definida como la relación entre la actividad de la enzima medida en presencia del inhibidor y el control. Los datos informados representan las medias \pm EEM.

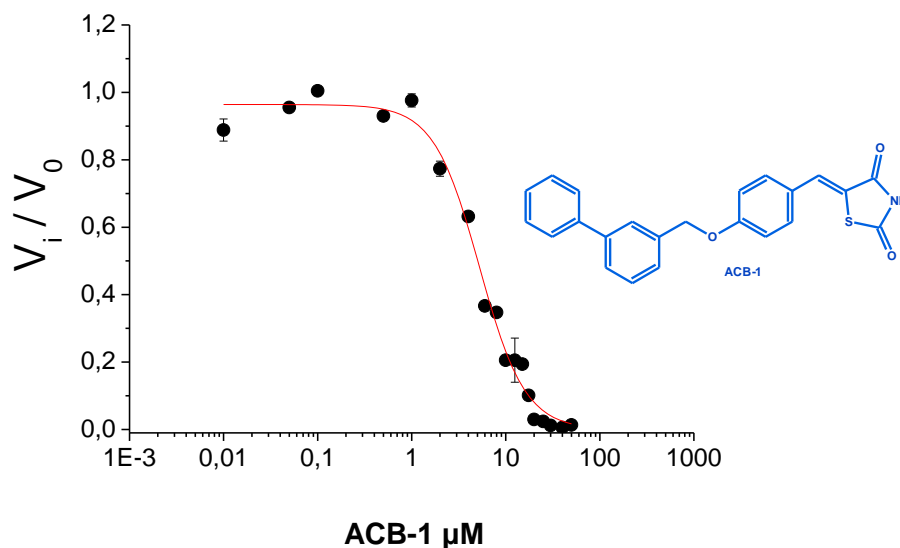
Para observar de una manera más clara la inhibición de los compuestos **ACB-1-10** hacia la enzima PTP1B se graficó el porcentaje de inhibición (Gráfica 12). De acuerdo a los resultados se obtuvo que los compuestos **ACB-1-3** y **ACB-5-6** correspondientes a la serie de las tiazolidindionas mostraron una inhibición en un intervalo del 96 al 98%. Por otro lado, los compuestos de la serie de ácidos fenilpropanoicos **ACB-7-10** se comportaron como inhibidores débiles.



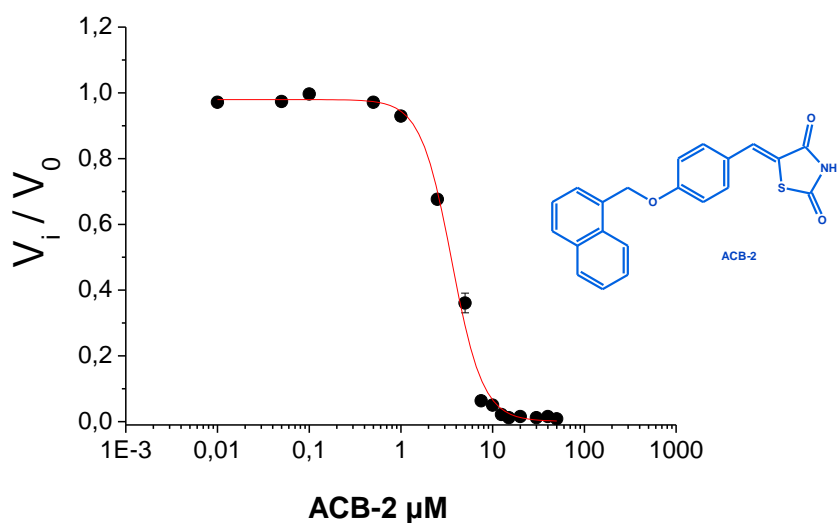
Gráfica 12. Porcentaje de inhibición de la enzima PTP1B por los compuestos **ACB-1-10**

Con base en lo anterior, se evaluó la potencia de inhibición de los compuestos más activos **ACB-1-3** y **ACB-5-6** a través del cálculo de la CI_{50} . Para éste ensayo se utilizó una concentración fija de sustrato (*p*-nitrofenilfosfato) correspondiente a la K_m de la enzima y variando las concentraciones de inhibidor.

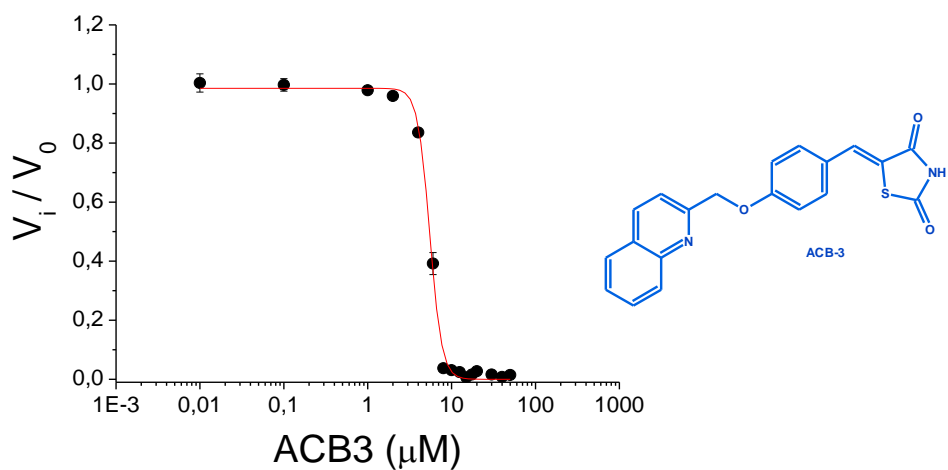
En las Gráficas 13-17 se muestran los resultados obtenidos de este ensayo.



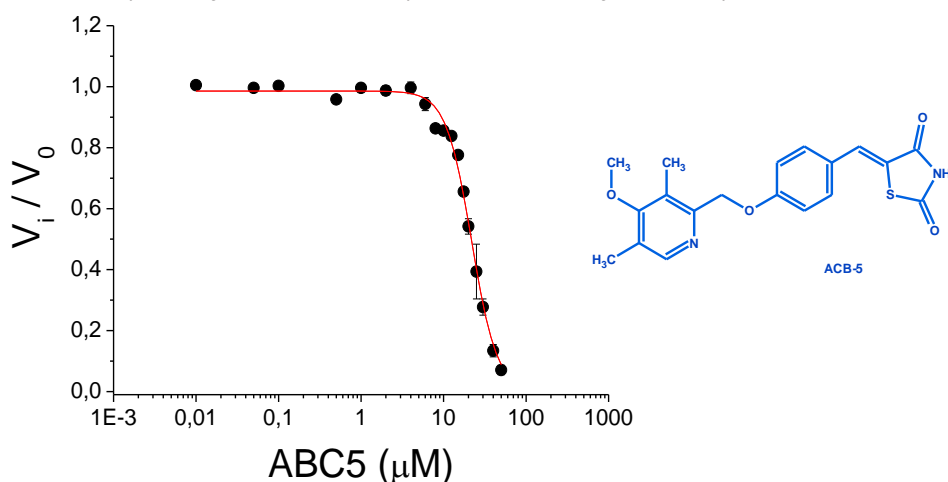
Gráfica 13. El valor de CI_{50} para el compuesto **ACB-1** se determinó trazando los datos de la actividad relativa de la PTP1B contra la concentración de inhibidor. Todas las pruebas fueron hechas en triplicado. Los datos informados representan las medias \pm EEM.



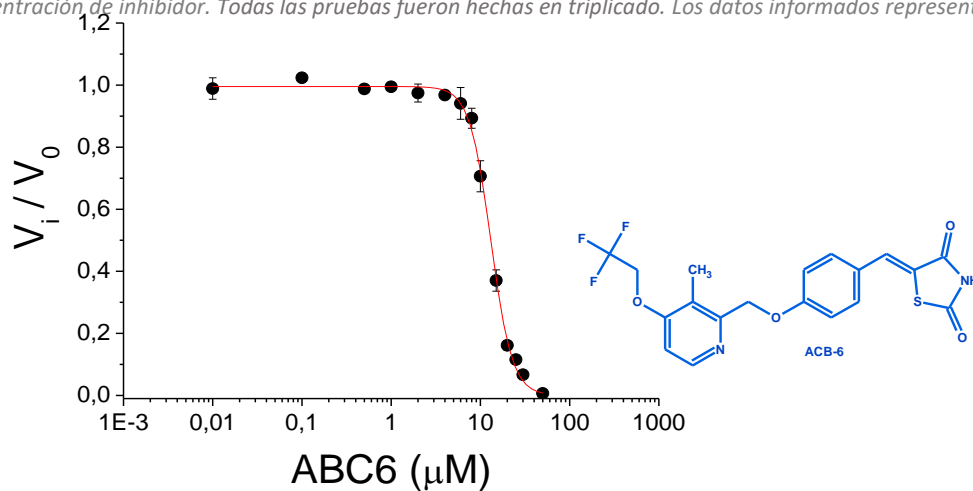
Gráfica 14. El valor de CI_{50} para el compuesto **ACB-2** se determinó trazando los datos de la actividad relativa de la PTP1B contra la concentración de inhibidor. Todas las pruebas fueron hechas en triplicado. Los datos informados representan las medias \pm EEM.



Gráfica 15. El valor de CI_{50} para el compuesto **ACB-3** se determinó trazando los datos de la actividad relativa de la PTP1B contra la concentración de inhibidor. Todas las pruebas fueron hechas en triplicado. Los datos informados representan las medias \pm EEM.



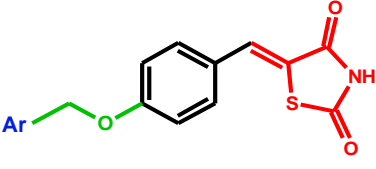
Gráfica 16. El valor de CI_{50} para el compuesto **ACB-5** se determinó trazando los datos de la actividad relativa de la PTP1B contra la concentración de inhibidor. Todas las pruebas fueron hechas en triplicado. Los datos informados representan las medias \pm EEM.



Gráfica 17. El valor de CI_{50} para el compuesto **ACB-6** se determinó trazando los datos de la actividad relativa de la PTP1B contra la concentración de inhibidor. Todas las pruebas fueron hechas en triplicado. Los datos informados representan las medias \pm EEM.

En la Tabla 27 se muestran las CI_{50} de los compuestos **ACB-1-3** y **ACB-5-6** los cuales fueron comparados con un inhibidor conocido de PTP1B el ácido ursólico (CI_{50} 4 μ M).

Tabla 27. CI_{50} de los compuestos **ACB-1-3** y **ACB-5-6** frente a la enzima PTP1B

		
Compuesto	Ar	CI_{50} (μ M)
ACB-1	3-Bifenil	5.3 \pm 0.3
ACB-2	1-Naftil	3.6 \pm 0.2
ACB-3	2-Quinolinil	5.5 \pm 0.1
ACB-5	2-Pridin-3,5-CH ₃ : 4-OCH ₃	22.0 \pm 0.5
ACB-6	Piridin-3-CH ₃ , 4-OCH ₂ -CF ₃	13.1 \pm 0.2
Ácido ursólico ¹¹⁴	----	4

Los datos representan la $CI_{50} \pm EEM$

Los compuestos **ACB-1** (Ar=3-Bifenil) y **ACB-3** (Ar=2-Quinolinil) mostraron una CI_{50} de entre 5.3 y 5.5 μ M respectivamente mostrando 0.7 veces la potencia del ácido ursólico. Por otro lado, el compuesto **ACB-2** que tiene como sustituyente Ar=1-Naftil presentó una CI_{50} de 3.6 μ M frente a la enzima PTP1B teniendo una potencia similar al ácido ursólico, colocándose así como el más activo de la serie. Cabe destacar que los compuestos **ACB-1-3** se colocaron en el bajo orden micromolar y son considerados como Hits experimentales $CI_{50} < 10\mu$ M.

La relación estructura-actividad reveló que la presencia de sustituyentes como: Ar=1-Naftil, Ar=3-Bifenil y Ar=1-Quinolinil, mismos que presentan buena lipofilidad (LogP) mejora la actividad inhibitoria frente a la enzima PTP1B. Lo anterior podría ser atribuido a que estas características favorecen la interacción del compuesto con el sitio catalítico de la enzima, ya que este contiene una región hidrofóbica importante la cual normalmente está ocupada por la tirosina fosforilada. Por otro lado, se observó que los compuestos que presentan una menor área polar superficial, la cual se define como la superficie de los átomos polares¹¹⁵

(generalmente oxígenos, nitrógenos e hidrógenos unidos) en una molécula, son los que presentan la mejor actividad inhibitoria sobre la enzima PTP1B (Figura 43).

Con respecto a los compuestos **ACB-5-6** que contienen el fragmento de piridina sustituido en las posiciones 3,4 y 5 manifestaron una Cl_{50} de 22 y 13.1 μM . En este caso relación estructura-actividad reveló que la sustitución con grupos electrodonadores como CH_3 , OCH_3 , $\text{OCH}_2\text{-CF}_3$ en las posiciones 3,4 y 5 del anillo de piridina resulta favorable para la actividad frente a la enzima PTP1B, ya que el compuesto **ACB-4** que no presenta ningún sustituyente no manifestó actividad inhibitoria frente a este blanco.

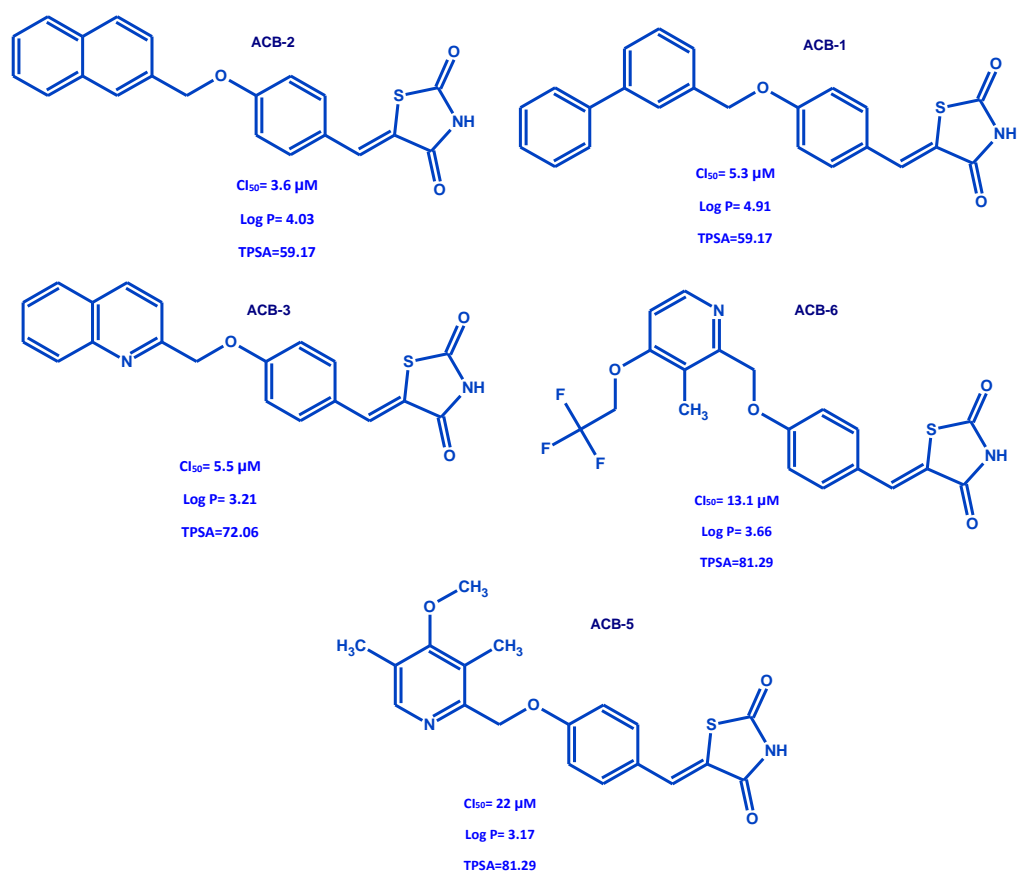


Figura 43. SAR vs la enzima PTP1B

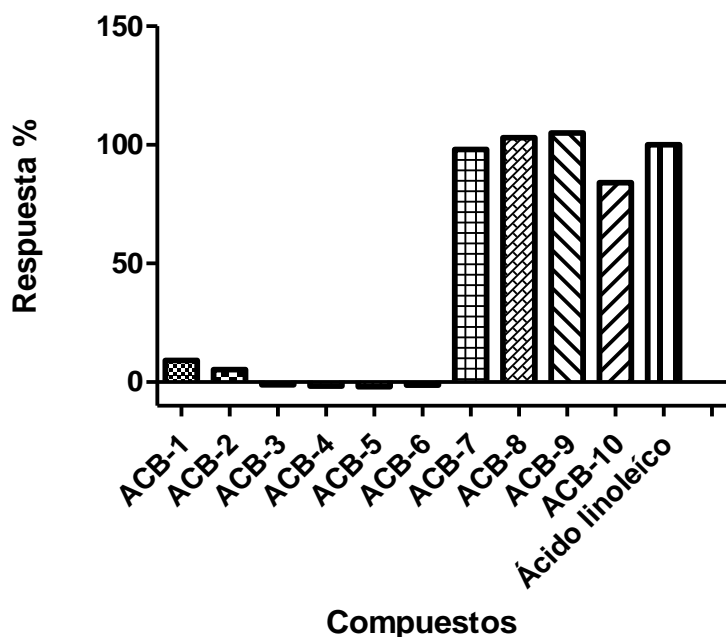
De acuerdo a lo anterior, los compuestos **ACB-1-3** resultan buenos candidatos para su posterior evaluación biológica, ya que presentaron una $Cl_{50} < 10 \mu\text{M}$; sin embargo resultaría conveniente priorizar al compuesto **ACB-2** ya que fue el que presentó la menor Cl_{50} 3.6 μM .

7.3.5 Evaluación *in vitro* sobre GPR40

Se midió la actividad agonista de los compuestos sintetizados **ACB-1-10** mediante un ensayo de movilización de calcio en células HEK-293 transfectadas con GPR40. Para esta

evaluación se utilizó DMSO como control negativo y ácido linoleico (1mM) como control positivo, también se decidió comparar frente al ácido docosahexaenoico que es un ligando endógeno de GPR40. Los compuestos se probaron por cuadruplicado a 100 μ M.

Movilización de calcio hGPR40/G α 16/HEK293



Gráfica 18. % de respuesta de los compuestos **ACB-10** en el ensayo de movilización de calcio en células HEK-293.

En la Tabla 28 se presenta el efecto sobre GPR40 de los compuestos, en concentraciones efectivas medias (CE_{50}) en valores μ M. El ácido linoleico resultó ser 1.8 veces más activo que el ácido docosahexaenoico (ligando endógeno).

De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que los compuestos de tipo tiazolidindionas **ACB-1-6** (Serie A) no mostraron actividad frente a éste receptor.

Los compuestos de tipo ácido fenilpropanoico **ACB-7-9** mostraron una respuesta de GPR40 de entre el 98-100 % (Gráfica 18) y por su parte el LA manifestó una respuesta del 100%. Lo anterior reveló que **ACB-7-9** presentan una eficacia similar al control.

El compuesto **ACB-7** que tiene como sustituyente Ar=3-Bifenil manifestó una CE_{50} 0.0755 μ M, siendo 110 veces más activo que el ácido linoleico y 196 veces más potente que el ácido docosahexaenoico. Cabe mencionar que LA y DHA son agonistas totales de GPR40. Por otro lado este compuesto se colocó como el más activo de la serie frente a este receptor.

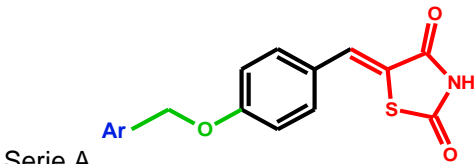
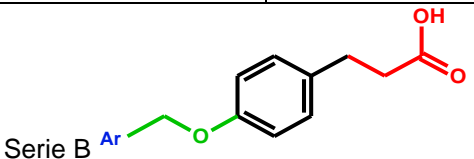
Para el compuesto **ACB-8** que tiene como sustituyente Ar=1-Naftil se observó una CE_{50} 0.648 μ M, presentando 12 veces mayor actividad que LA y 22 veces más potencia que DHA.

El compuesto **ACB-9** que tiene como sustituyente Ar=4-Bifenil-2-carbonitrilo manifestó una CE_{50} 0.797 μ M, resultando 10.4 veces más potente que LA y 18.6 veces más activo que DHA.

De acuerdo a las CE_{50} de los compuestos **ACB-7-9** estos se colocaron como compuestos líderes experimentales $CI_{50} < 1 \mu$ M.

En el análisis SAR frente a GPR40 se observó que los compuestos de **ACB-7-9** tienen como fragmento ácido al ácido fenilpropiónico a diferencia de los compuestos **ACB-1-6** que presentan a la tiazolidindiona. De manera adicional se observó que los compuestos **ACB-7-9** que tienen como núcleo (fragmento lipofílico) anillos de bifenilo y naftaleno, los cuales podrían interaccionar con aminoácidos hidrofóbicos en el sitio activo de GPR40. Por otro lado, se observó que los compuestos **ACB-7-9** presentan un Log P calculado menor al que presenta **TAK-875** LogP=4.9. Lo anterior resulta importante ya que un Log P alto en los agonistas de GPR40 se ha asociado a hepatotoxicidad ¹¹⁶, razón por la cual no existe ningún agonista de GPR40 en el mercado. Debido a lo anterior es de suma importancia el desarrollo de agonistas de GPR40 más polares como **ACB-7-9** Figura 44.

Tabla 28. Actividad agonista de los compuestos **ACB-1-10** sobre GPR40.

Compuesto	Ar	CE ₅₀ μM	Respuesta máxima % (100μM)
 <p>Serie A</p>			
ACB-1	3-Bifenil	----	9.1
ACB-2	1-Naftil	----	5.3
ACB-3	2-Quinolinil	----	-1-1
ACB-4	2-Piridin	----	-1.6
ACB-5	2-Pridin-3,5-CH ₃ : 4-OCH ₃	----	-2.0
ACB-6	Piridin-3-CH ₃ , 4-OCH ₂ -CF ₃	----	-1.3
 <p>Serie B</p>			
ACB-7	3-Bifenil	0.0755 ± 0.023	98 ± 10
ACB-8	1-Naftil	0.648 ± 0.1	103 ± 3 12, 22 10.4, 18.6
ACB-9	4-Bifenil-2-carbonitrilo	0.797 ± 0.17	105 ± 15
ACB-10	2-Quinolinil	100	84
Ácido linoleico (LA)	----	8.30 ± 1.7	100
Ácido docosahexaenoico (DHA)	----	14.86 ⁶⁷	100

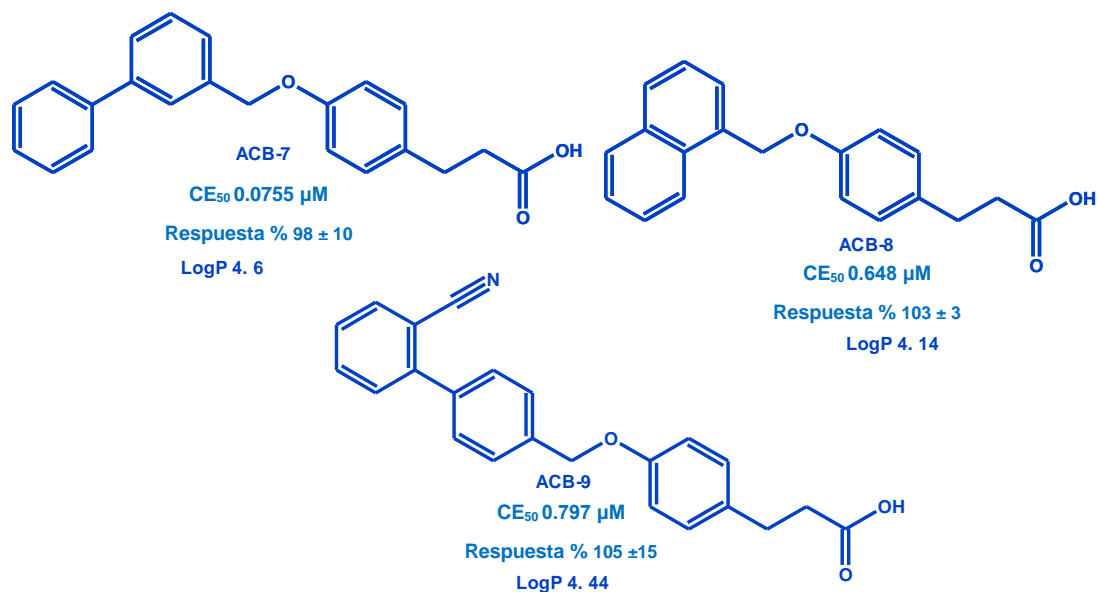


Figura 44. SAR vs GPR40

GPR40 resulta un blanco interesante debido a que sus niveles de expresión basales en un estado normal son bajos; sin embargo, en la hiperglucemia se encuentra sobrerregulado no obstante una vez que esta se normaliza el nivel de expresión de GPR40 también, de tal modo que no se presenta hipoglucemia, incluso si el agonista está todavía en circulación. Esto resulta una ventaja frente a los segretagogos directos de insulina como las sulfonilureas y las glinidas; ya que no sólo no representa riesgo de hipoglucemia, sino que evita el rápido agotamiento de las células β -pancreáticas.

Una vez llevado a cabo el análisis de consenso farmacológico a través diversos programas quimioinformáticos, ensayos de funcionalidad celular, así como los ensayos *in vitro* sobre la actividad inhibitoria de la enzima aldosa reductasa y PTP1B, ensayos *in vitro* sobre los receptores PPAR- α/γ y GPR40 se eligieron a los compuestos **ACB-1**, **ACB-4**, **ACB-6**, **ACB-7**, **ACB-8** y **ACB-9** para su evaluación *in vivo*.

7.4 PARTE *IN VIVO*

Se evaluó la actividad antidiabética de los compuestos **ACB-1**, **ACB-6**, **ACB-7**, **ACB-8** y **ACB-9** usando un modelo de ratón no insulino-dependiente diabetizado con estreptozotocina-nicotinamida.

Debido a que se ha observado que los ratones son más resistentes a la diabetización con estreptozotocina-nicotinamida y era necesario aplicar múltiples dosis de estreptozotocina se decidió llevar a cabo el ensayo utilizando un modelo de no insulino-dependiente diabetizado con una dosis única estreptozotocina para los compuestos **ACB-4** y **ACB-8**.

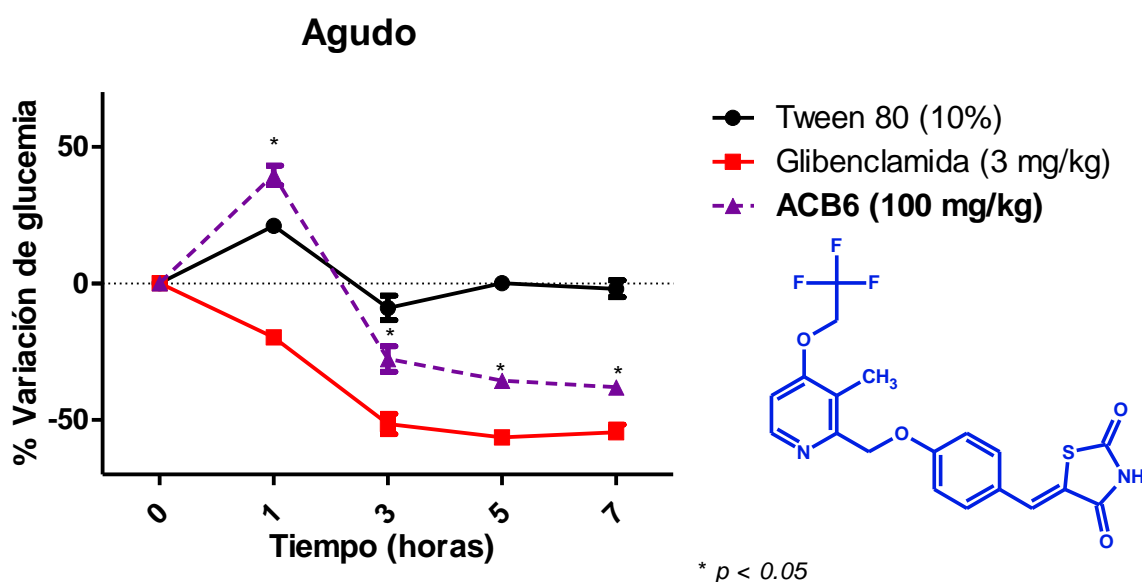
Es muy importante mencionar que ambos modelos resultaron adecuados para la evaluación *in vivo*.

7.4.1 Evaluación *in vivo* del efecto antidiabético del compuesto ACB-6 utilizando un modelo murino de diabetes no insulino-dependiente

La Glibenclamida fue tomada como control hipoglucémico.

La actividad hipoglucémica de los compuestos a evaluar fue determinada usando una dosis única de 100 mg/kg.

El compuesto **ACB-6** mostró la mejor actividad inhibitoria (CI_{50} 1.9 μ M) sobre la enzima aldosa reductasa, por tal motivo se eligió para su evaluación *in vivo*.



Gráfica 19. Efecto de dosis única de **ACB-6** (100 mg/kg) en modelo murino de diabetes no insulino-dependiente.

El compuesto **ACB-6** mostró un aumento en los valores de glucemia durante la primera hora (Gráfica 19), éste fenómeno ya había sido reportado en nuestro grupo de trabajo por el compuesto **MGJ-8**, el cual contiene un fragmento 3-metil-4-(2,2,2-trifluoroetoxi)piridina. Esto es importante ya que los compuestos **ACB-6** y **MGJ-8**⁶⁷ comparten este fragmento y a su vez con el Lansoprazol, un fármaco inhibidor de la ATPasa (Figura 45).

En un trabajo previo se generó una hipótesis que implica la regulación de la secreción de insulina en células β pancreáticas, en donde la presencia del fragmento 3-metil-4-(2,2,2-trifluoroetoxi)piridina presente en **ACB-6**, **MGJ-8** y Lansoprazol pudo haber inhibido la

ATPasa impidiendo la hidrólisis de ATP/ADP y por ende el bloqueo de los canales de K⁺, no permitiendo la correcta translocación de gránulos de insulina al exterior de la célula, hecho que se tradujo en el aumento de los niveles de glucemia de los ratones durante la primera hora postadministración oral de **MGJ-8**¹¹⁷ y **ACB-6**.

Aunado a lo anterior, existen datos de en un estudio donde participaron 33856 personas a través de la FDA y redes sociales, que muestran que alrededor de 156 pacientes que tomaron Lansoprazol presentaron hiperglicemia. La mayoría de los pacientes fueron hombres mayores de 60 años que habían tomado este fármaco durante un mes y que padecen diabetes.⁹⁰

Por otro lado, **ACB-6** mostró la mejor actividad inhibitoria (CI₅₀ 1.9µM) sobre la enzima aldosa reductasa. Esta enzima en condiciones normales está implicada en el metabolismo de glucosa a través de la vía de los polioles, en donde cataliza la reducción dependiente de NADPH de la glucosa a sorbitol. Lo anterior, da pie a hipotetizar que al inhibir dicha enzima las concentraciones de glucosa se vean aumentadas, ya que esta no está siendo metabolizada a sorbitol y por lo tanto se observa un efecto hiperglucemiante; sin embargo a partir de la tercera hora se observó una disminución significativa de la glucemia, la cual se mantuvo hasta la séptima hora del ensayo.

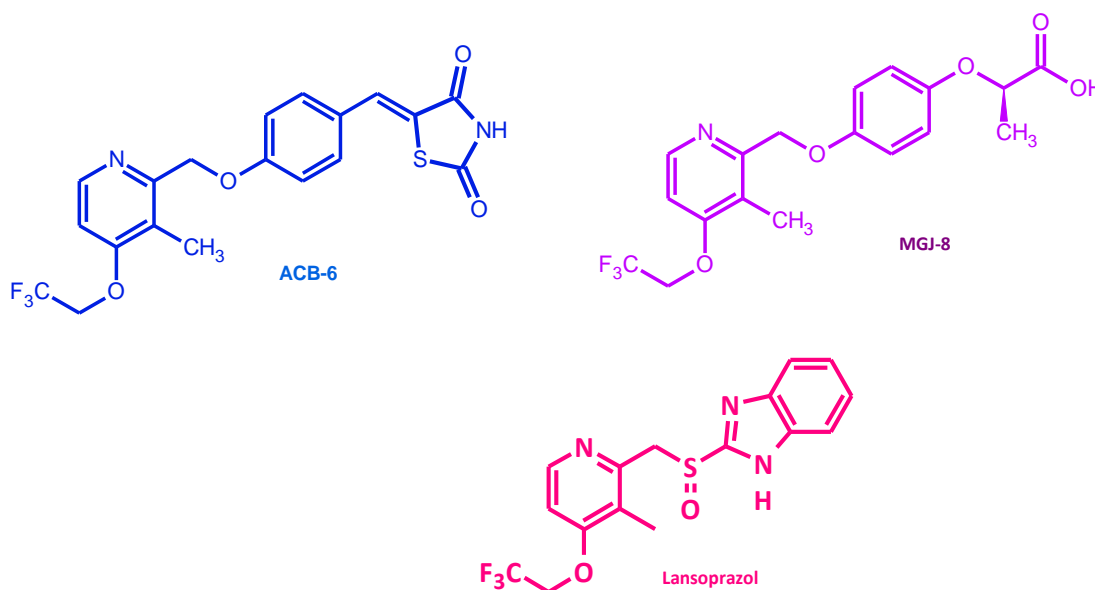
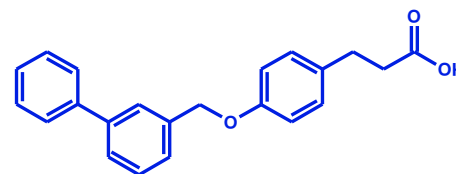
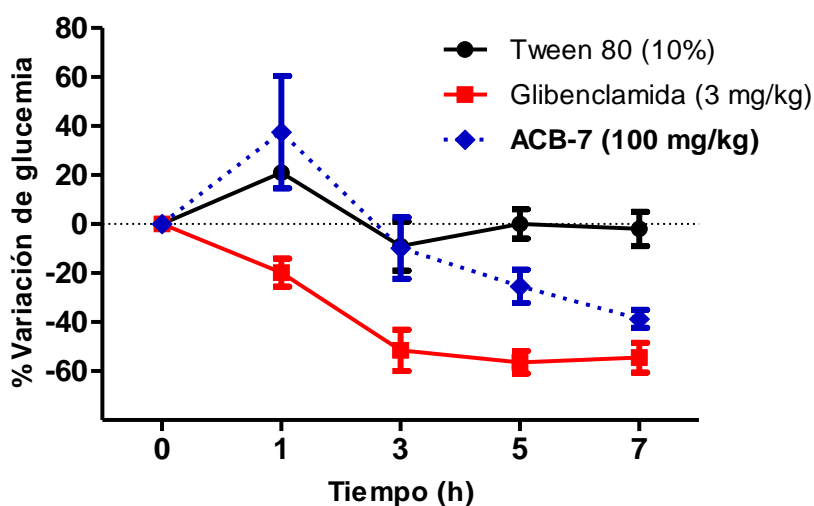


Figura 45. Comparación del compuesto **ACB-6** con **MGJ-8** y Lansoprazol y el fragmento común.

7.4.2 Evaluación *in vivo* del efecto antidiabético del compuesto ACB-7 utilizando un modelo murino de diabetes no insulino-dependiente.

El compuesto **ACB-7** fue elegido para evaluar su actividad en un modelo *in vivo* por la presencia del bifenilo en la porción lipofílica de la molécula, ya que se ha observado que éste tipo de sustituyentes presentan una buena actividad antidiabética.¹⁵ Además presentó uno de los mejores puntajes en los ensayos *in silico*. Por otro lado, este compuesto reveló una CI_{50} de 7.4 μM sobre la enzima aldosa reductasa y una CE_{50} 0.0755 μM sobre GPR40.

En la Gráfica 20 se observa una tendencia a la baja de glucemia a partir de la tercera y quinta hora postadministración hasta en un 38.7 %; hecho que puede ser asociado con su actividad frente a GPR40 ya que no se mostraron niveles de glucosa más bajos que los basales.



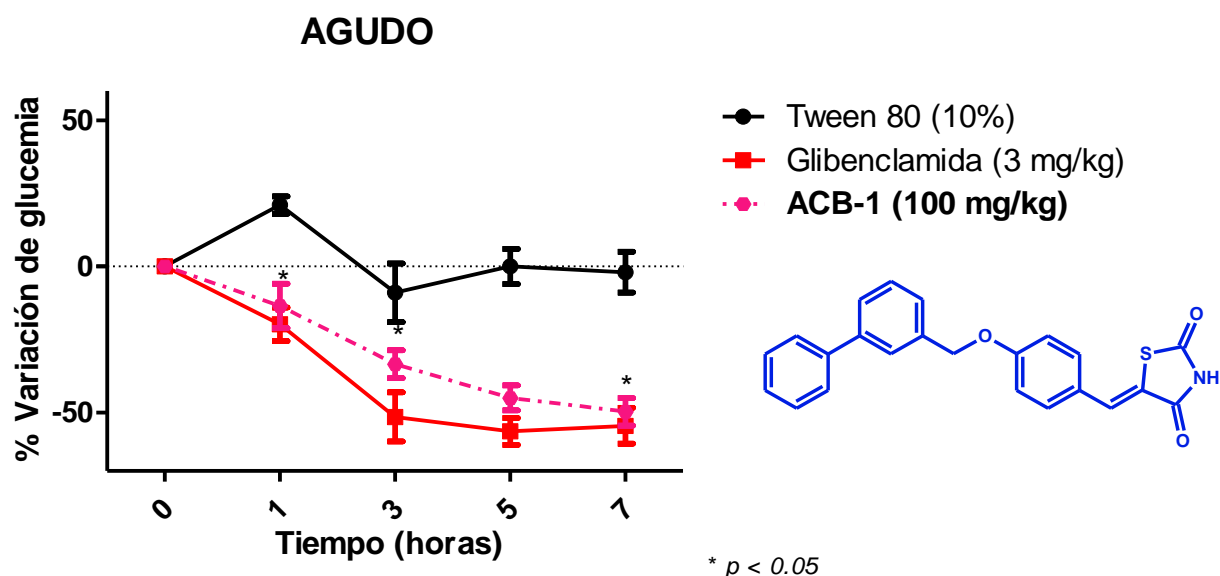
Gráfica 20. Efecto de dosis única de ACB-7 (100 mg/kg) en modelo murino de diabetes no insulino-dependiente.

7.4.3 Evaluación *in vivo* del efecto antidiabético del compuesto ACB-1 utilizando un modelo murino de diabetes no insulino-dependiente

El compuesto **ACB-1** fue elegido para evaluar su actividad en un modelo *in vivo* por la presencia del bifenilo en la porción lipofílica de la molécula, ya que se ha observado que éste tipo de sustituyentes presentan una buena actividad antidiabética. Por otro lado esta molécula mostró actividad *in vitro* sobre PPAR- γ , asimismo manifestó actividad inhibitoria sobre PTP1B con una CI_{50} de 5.3 μM .

En la Gráfica 22 podemos observar un comportamiento similar a la Glibenclamida desde la primera hora post-administración. Teniendo una disminución de la glucemia desde un 13.49

% y un efecto sostenido de -49.73 % que corresponde a una glucemia de 65.6 mg/dL hasta la séptima hora. Lo anterior, sugiere que éste compuesto actúa a través de una combinación de los mecanismos insulinosensibilizadores de PPAR- γ y PTP1B tal como se observó en los ensayos *in vitro*.

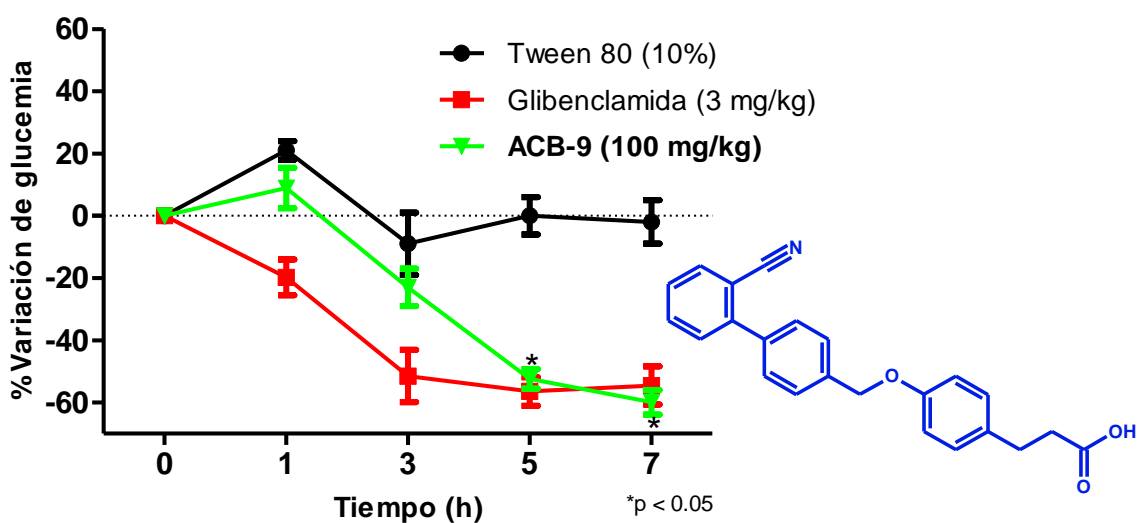


Gráfica 21. Efecto de dosis única de **ACB-1** (100 mg/kg) en modelo murino de diabetes no insulino-dependiente.

7.4.4 Evaluación *in vivo* del efecto antidiabético del compuesto **ACB-9** utilizando un modelo murino de diabetes no insulino-dependiente

El compuesto **ACB-9** se eligió para su evaluación *in vivo* debido a que presentó parámetros adecuados en los ensayos *in silico*. Por otro lado esta molécula en ensayos *in vitro* mostró aumentar la expresión relativa de PPAR- γ y GLUT-4, además reveló una CE_{50} de 0.797 μ M sobre GPR40.

Se observa (Gráfica 22) una disminución significativa de la glucemia de **ACB-9** a partir de la tercera hora, con un decremento de entre un 23.95% a un 59.9 % hasta la séptima hora, dicho efecto se mantuvo hasta el final del ensayo.



Gráfica 22. Efecto de dosis única de ACB-9 (100 mg/kg) en modelo murino de diabetes no insulino-dependiente.

Este fenómeno puede atribuirse a varios factores. En primer lugar, el efecto observado hasta las tres horas podría deberse a que **ACB-9** es un ácido carboxílico y se encuentra ionizado a pH fisiológico, por lo tanto su absorción se ve disminuida así como su biodisponibilidad.

Por otro lado, **ACB-9** mostró actividad *in vitro* sobre PPAR- γ , el cual actúa a nivel de transcripción de genes y su efecto es observable en este modelo aproximadamente hasta 5 horas después de la administración. Por lo tanto, el efecto sobre la disminución de glucosa puede ser atribuido a una combinación de PPAR- γ (insulinosensibilizador) y a través del agonismo de GPR40, ya que este compuesto manifestó actividad en un ensayo *in vitro* sobre este receptor. Adicionalmente los valores de glucosa obtenidos no disminuyeron más allá de los niveles basales, esto concuerda con el mecanismo insulinosensibilizador de PPAR- γ y la liberación de insulina dependiente de glucosa de GPR40.

7.4.5 Evaluación *in vivo* del efecto antidiabético del compuesto ACB-4 utilizando un modelo murino de diabetes no insulino-dependiente

El compuesto **ACB-4** fue elegido para evaluar su actividad en un modelo *in vivo* debido a que presentó la mejor actividad frente a PPAR- γ aumentando 8.8 veces la expresión relativa de éste receptor; además se observó un ligero aumento de 1.4 veces la expresión relativa de GLUT-4 que es su producto de activación. Dicho efecto puede ser atribuido a la similitud estructural de **ACB-4** con el fármaco Pioglitazona. Sin embargo el compuesto **ACB-4** presenta un doble enlace entre el anillo aromático central y la tiazolidindiona, con esto se

pretende que sea un agonista parcial de este receptor, ya que muchos de los efectos adversos presentados por las tiazolidindionas se asocian a los agonistas totales como Pioglitazona Figura 46.

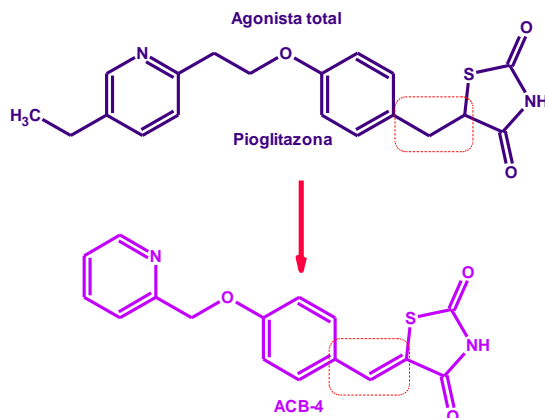
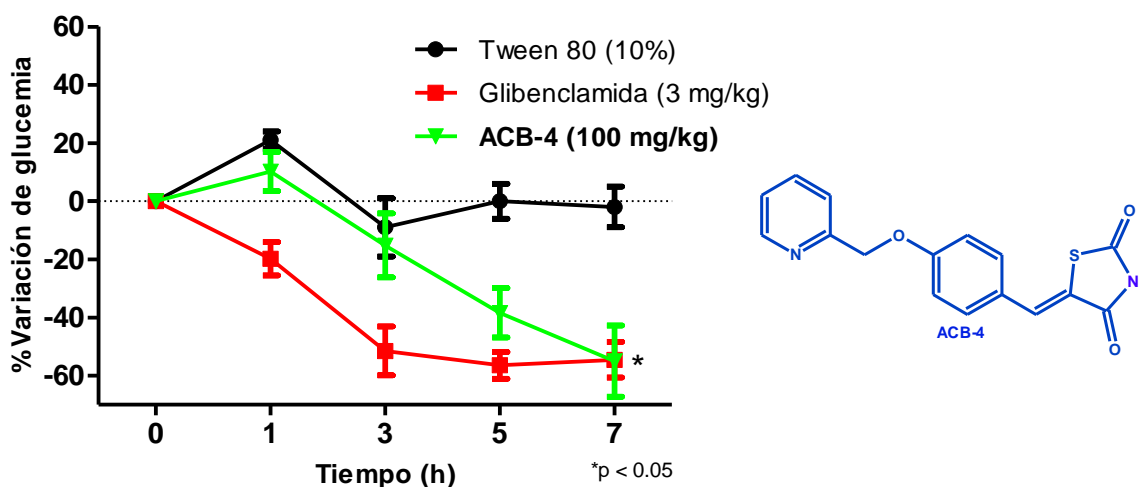


Figura 46. Comparación estructural de Pioglitazona (agonista total) y el compuesto ACB-4.



Gráfica 23. Efecto de dosis única de ACB-4 (100 mg/kg) en modelo murino de diabetes no insulino dependiente

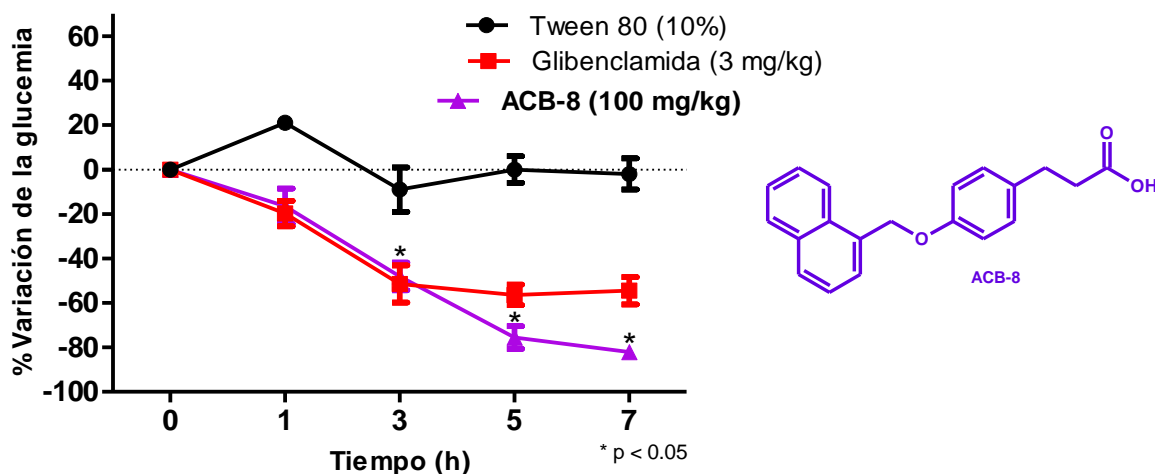
Se observa (Gráfica 23) un efecto constante de disminución de la glucemia a partir de la tercera hora (15.2%), por otra parte en la séptima hora se observa una disminución significativa de glucosa de un 55%. Cabe mencionar que los niveles de glucosa no disminuyeron más allá de los niveles basales (103 mg/dL), lo cual está acorde con el mecanismo de acción insulinosensibilizador encontrado en los ensayos *in vitro* sobre PPAR- γ .

7.4.6 Evaluación *in vivo* del efecto antidiabético del compuesto ACB-8 utilizando un modelo murino de diabetes no insulino-dependiente

El compuesto **ACB-8** se eligió para su evaluación *in vivo* debido a que presentó buena actividad sobre GPR40 obteniendo una CE_{50} de 0.648 μ M. Por otro lado se observó un incremento de la expresión relativa de PPAR- γ similar a Pioglitazona. Cabe mencionar que este compuesto obtuvo una buena calificación en el análisis consenso de los ensayos *in silico*; sin embargo se había descartado debido a la presencia del anillo de naftaleno el cual está asociado a toxicidad, no obstante resulta interesante corroborar esto mediante más ensayos.

El compuesto **ACB-8** mostró una disminución significativa de la glucemia similar a Glibenclamida desde la primera hora y se sostuvo hasta la séptima hora. Por otra parte mostró valores de glucosa por debajo de los basales 55 mg/dL y 41 mg/dL en la quinta y séptima hora respectivamente. Esto sugiere que éste compuesto podría ser un agonista total de GPR40 ya que este tipo de ligandos no solo promueven la secreción de insulina dependiente de glucosa, sino que también tienen un efecto incretinomimético promoviendo la secreción de GLP-1 y GIP, lo cual explica el descenso de glucosa por debajo de los basales.

De manera adicional, sería adecuado llevar a cabo un ensayo de funcionalidad celular con este compuesto, para corroborar que los bajos niveles de glucosa mostrados en este ensayo no se deban a la toxicidad intrínseca de la molécula debido a la presencia de naftaleno.



Gráfica 25. Efecto de dosis única de ACB-8 (100 mg/kg) en modelo murino de diabetes no insulino-dependiente.

A manera de resumen se muestra en la Tabla 29, los resultados obtenidos en el ensayo *in vivo* en un modelo murino no insulino dependiente.

Tabla 29. Porcentaje de variación de glucemia.

Compuesto	Dosis (mg/Kg)	0 h	1 h	3 h	5 h	7 h
ACB-1	100	0	-13.49	-33.48	-44.99	-49.73
ACB-6	100	0	39.57	-27.70	-35.69	-38.06
ACB-4	100	0	10.2	-15.2	-38.4	-55
ACB-7	100	0	37.54	-9.81	-25.43	-38.67
ACB-8	100	0	-16.50	-48.10	-75.60	-82.10
ACB-9	100	0	8.90	-23.95	-52.39	-59.92
Glibenclamida	3	0.00	-19.79	-51.48	-56.41	-54.52

7.5 PARTE *IN SILICO* A POSTERIORI

7.5.1 Acoplamiento molecular sobre la enzima aldosa reductasa.

7.5.1.1 Validación de acoplamiento molecular sobre la enzima aldosa reductasa.

Para el acoplamiento molecular de nuevos ligandos se debe asegurar que la predicción de su modo de unión con el blanco farmacológico se lleve a cabo con éxito. Por tal motivo, se realizó la validación de su acoplamiento. Este consiste en el reacomodar el ligando co-cristalizado (**IDD 740**) sobre la enzima aldosa reductasa.

A continuación, se muestran los resultados (Tabla 30) de la validación en donde se observa que se conservan todas las interacciones del ligando co-cristalizado. Además, arrojó un puntaje de -8.58 kcal/mol.

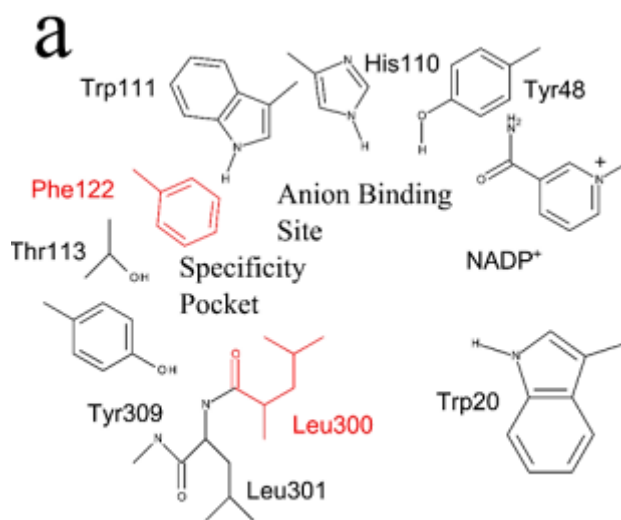
Tabla 30. Validación acoplamiento molecular aldosa reductasa del ligando cocristalizado IDD 740 (3G5E)

Interacciones por puente de hidrógeno	Interacciones $\pi-\pi$	Interacciones débiles van der Waals	Puntaje (kcal/mol)	RMSD (Å)
Tyr48, His110, Trp111	Trp 20, Trp 11	Leu 300, Phe 122, Trp 219	-8.58	0.5

Con la finalidad de comprender las interacciones que los compuestos diseñados **ACB-6-7** podrían presentar con el sitio activo de aldosa reductasa, se mencionan continuación algunas de sus características más importantes.

El sitio activo de aldosa reductasa está conformado por dos subcavidades, las cuales tienen diferentes propiedades de plasticidad. La primera es considerada como rígida y es llamada “sitio de unión a anión” que se compone de aminoácidos como Tyr 48, His 110 y Lys 77, mismos que participan en el ciclo catalítico de la enzima; por otro lado, en esta subcavidad es donde está presente la coenzima NADPH. La segunda subcavidad está conformada por aminoácidos como Trp 111, Tyr 309 y Cys 303, Phe 122, Ala 299, Cys 298, Ser 302 y muestra un alto grado de flexibilidad en aminoácidos como Val 297, Leu 300 y Trp 219.¹⁶

15.

Figura 47. Sitio de unión de inhibidores de AR.⁸³

Para el análisis de similitud molecular se tomó en cuenta los modos de unión arrojados en el acoplamiento molecular.

7.5.1.1 Acoplamiento molecular del compuesto ACB-6 sobre la enzima aldosa reductasa

Se reagruparon los modos de unión con un RMSD= 1 Å obteniendo un cónformero. Éste presentó un puntaje de -9.55 kcal/mol siendo mejor que la mostrada por **IDD 740** en la validación.

El compuesto **ACB-6** mostró interacciones por puente de hidrógeno con Trp20 (aminoácido presente en el sitio de unión a anión). Por otro lado, se observó una interacción extra que no está presente en el ligando co-cristalizado con Val 47 entre el NH de la posición 3 del mismo anillo. Cabe mencionar que este aminoácido forma parte de la subcavidad flexible del sitio activo de aldosa reductasa, además ésta interacción se ha observado en otros compuestos de tipo tiazolidindiona y mercaptotriazinoindol en estudios previos.^{16,15,83} (Figura 48).

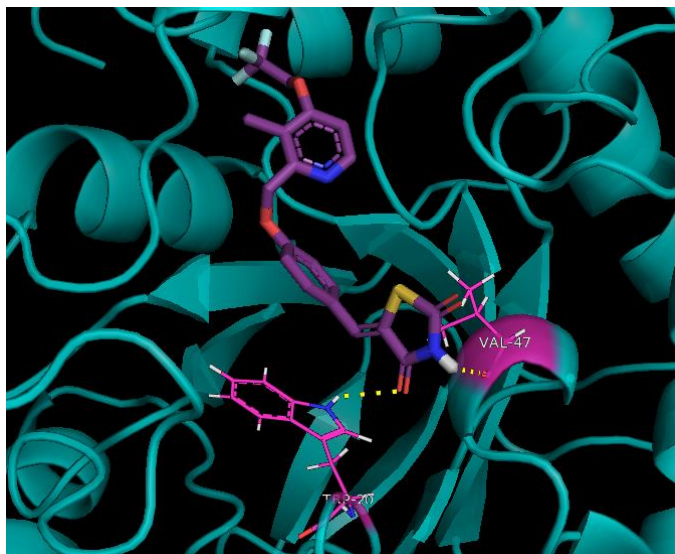


Figura 48. Visualización en tres dimensiones del compuesto **ACB-6** (morado) en la cavidad del sitio activo de aldosa reductasa (cian); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrógeno (amarillo) de los aminoácidos en color rosa (Trp 20 y Val 47).

Con respecto al diagrama de interacción 2D (Figura 49) se muestra que el compuesto **ACB-6** conserva interacciones de tipo π - π entre el anillo de piridina con Trp 111, así como una interacción adicional con Phe 115, lo cual podría reforzar la interacción de este ligando. Así mismo se observa que se conservan algunas interacciones de van der Waals con Trp 219, Leu 300 y Phe 122.

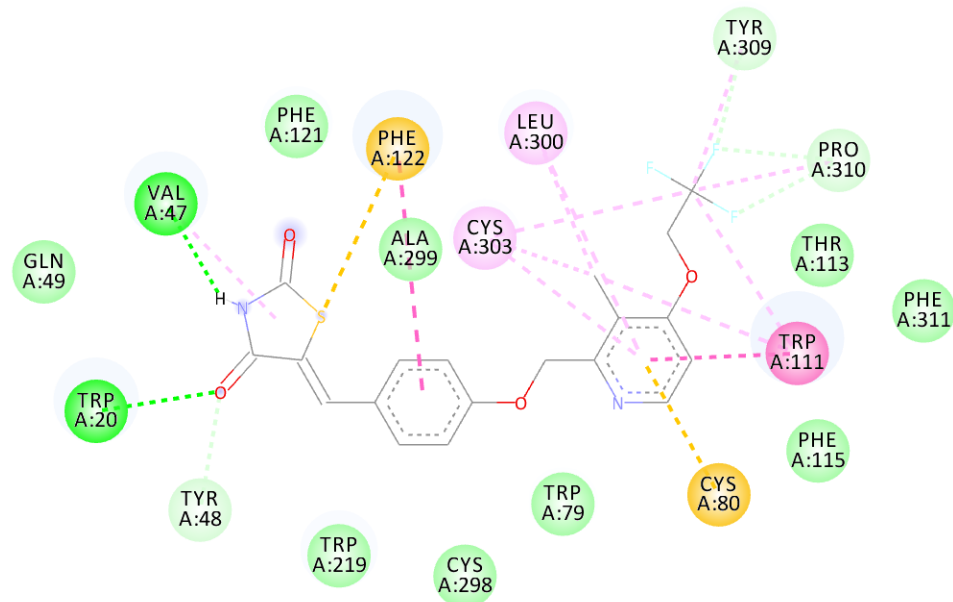


Figura 49. Visualización en dos dimensiones del compuesto **ACB-6** en el sitio activo de aldosa

7.5.1.2 **Sol**reductasa; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).

En la Figura 50 se muestra que el compuesto **ACB-6** (magenta) y el ligando co-cristalizado **IDD 740** (verde) ocupan el mismo espacio en el sitio activo en aldosa reductasa. Adicionalmente se muestra que **IDD 740** se encuentra internalizado en las dos subcavidades del sitio activo, mientras que el fragmento ácido de **ACB-6** está ligeramente expuesto. Lo anterior, podría explicar la diferencia en sus interacciones; no obstante, mantiene interacciones con el sitio de unión a anión y presenta algunas interacciones extras en la subcavidad flexible de esta enzima.

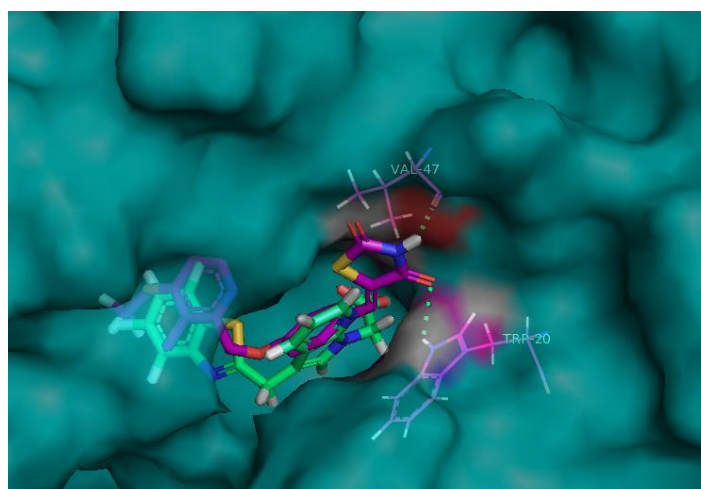


Figura 50. Sobreposición del compuesto **ACB-6** (magenta) con **IDD 740** (verde) en la cavidad de aldosa reductasa.

El sobreposicionamiento molecular y acoplamiento molecular correlacionan con el ensayo de inhibición enzimática en donde **ACB-6** reveló una CI_{50} de 1.9 μM siendo el más activo de la serie.

7.5.1.3 Acoplamiento molecular del compuesto ACB-7 sobre la enzima aldosa reductasa

Para la elección de éste conformero, se tomó en cuenta la similitud espacial del ligando co-cristalizado. Éste presentó un puntaje de -8.28 kcal/mol similar a **IDD 740**.

El compuesto **ACB-7** mostró que conserva interacciones por puente de hidrógeno con Trp20 con el carbonilo del fragmento ácido de la molécula (**ACB-7**), así mismo se observa una interacción de puente de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del enlace éter y el Trp 111 probablemente debido a que éste fragmento se encuentra próximo a la parte ácida de **IDD 740** tal como se muestra en la Figura 51.

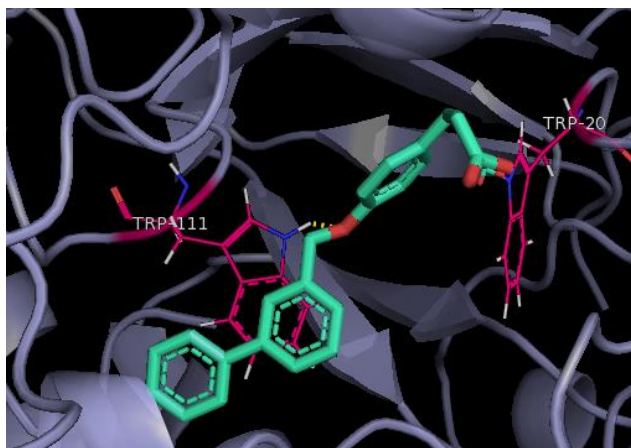


Figura 51. Visualización en tres dimensiones del compuesto **ACB-7** (verde) en la cavidad del sitio activo de aldosa reductasa (gris); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en color rosa (Trp 20 y Trp 111).

En el diagrama de interacción 2D se observa una doble interacción de tipo $\pi-\pi$ de los anillos de bifenilo de **ACB-7** con Trp 111 el cual forma parte de las interacciones del ligando co-cristalizado de esta enzima. Del mismo modo se muestra que se conservan algunas interacciones de van der Waals con Trp 219, Leu 300 y Phe 122; así como interacciones de este tipo con otros aminoácidos presentes en la subcavidad flexible del sitio activo.

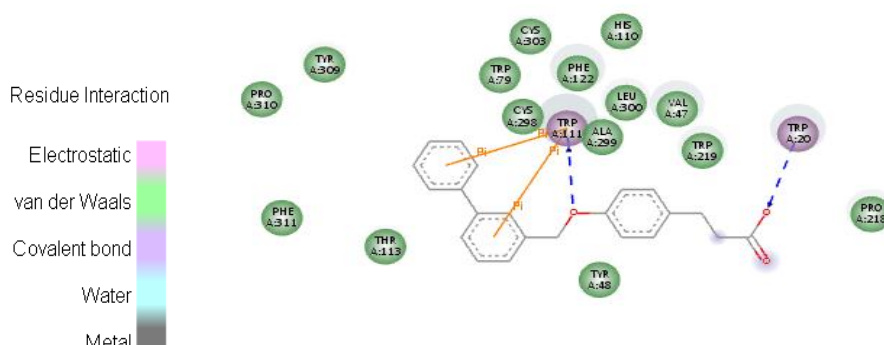


Figura 52. Visualización en dos dimensiones del compuesto **ACB-7** en el sitio activo de aldosa reductasa; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).

7.5.1.4 Sobreposición del compuesto **ACB-7** e **IDD 740** sobre la enzima aldosa reductasa. En la Figura 53 se muestra que el compuesto **ACB-7** (cian) y el ligando co-cristalizado **IDD 740** (azul marino) ocupan el mismo espacio en el sitio activo en aldosa reductasa. **IDD 740** se encuentra internalizado en las dos subcavidades del sitio activo, mientras que el fragmento ácido de **ACB-7** está ligeramente expuesto. Sin embargo, conserva interacciones por puente de hidrógeno con los aminoácidos del sitio catalítico de la enzima; así como interacciones de tipo van der Waals.

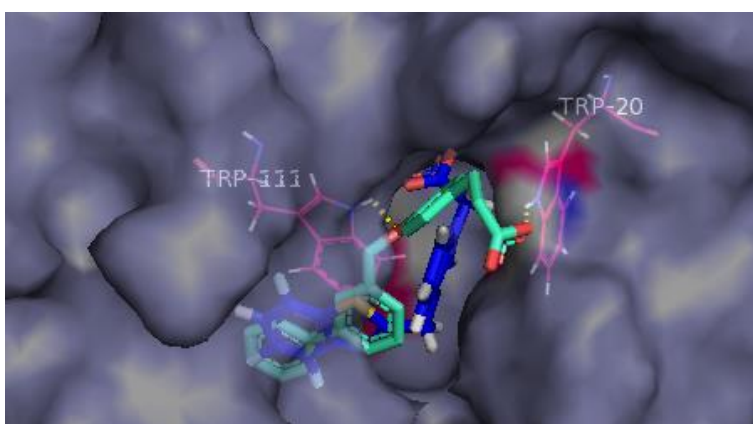


Figura 53. Sobreposición del compuesto **ACB-7** (cian) con **IDD 740** (azul marino) en la cavidad de aldosa reductasa. Lo anterior, correlaciona con el ensayo de inhibición enzimática en donde **ACB-7** reveló una Cl_{50} de 7.4 μ M siendo el segundo más activo de la serie B.

Con base en lo anterior, se encontró una correlación entre los ensayos *in vitro* de inhibición enzimática sobre aldosa reductasa y el acoplamiento molecular, ya que el compuesto **ACB-6** (-9.55 kcal/mol, Cl_{50} =1.9 μ M) arrojó el mejor puntaje con respecto a **ACB-7** (-8.28 kcal/mol, Cl_{50} =7.4 μ M), manifestando así la mejor actividad inhibitoria sobre aldosa reductasa.

7.5.2 Acoplamiento molecular sobre PPAR- γ 7.5.2.1 Validación de acoplamiento molecular sobre PPAR- γ

A continuación, se muestran los resultados (Tabla 31) de la validación en donde se observa que se conservan todas las interacciones del ligando co-cristalizado. Arrojando un puntaje de -6.11kcal/mol y un RMSD de 0.95 Å.

Tabla 31. Validación de acoplamiento molecular del ligando co-cristalizado Tesaglitazar (171) sobre PPAR- γ

Interacciones con residuos de aminoácidos	Puntaje (kcal/mol)	RMSD (Å)
His 449, His 323, Ser 289, Tyr 473	-6.11	0.95

En la Figura 54 se observa que Tesaglitazar muestra interacciones de tipo puente de hidrógeno con His 449, His 323, Ser 289 y Tyr 473. Por otro lado en el mapa de interacciones en 2 dimensiones (Figura 55) se muestra una interacción π - π con Tyr 473.

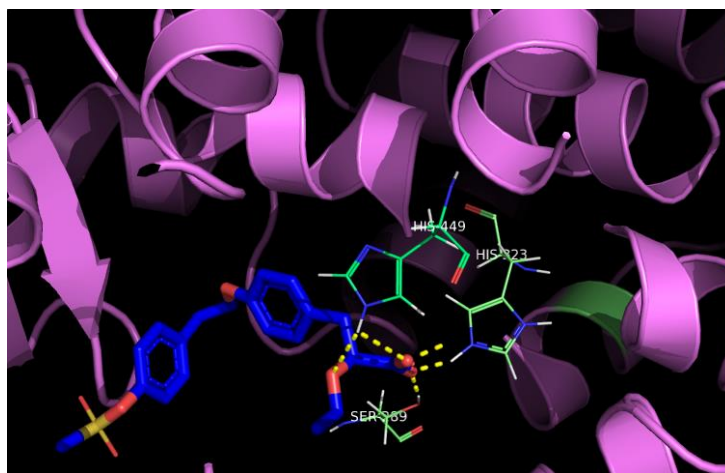


Figura 54. Visualización en tres dimensiones de Tesaglitazar (azul) en la cavidad del sitio activo de PPAR- γ (rosa); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrógeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (His 449, His 323, ser 289).

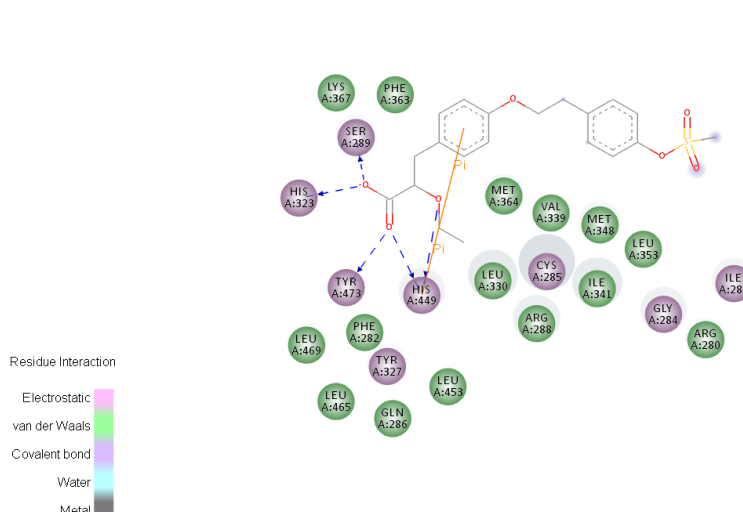


Figura 55. Visualización en dos dimensiones de Tesaglitazar en el sitio activo de PPAR- γ ; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).

Para comprender un poco más las características del sitio activo de PPAR- γ a continuación se da una breve descripción de este.

El sitio activo de PPAR- γ está conformado por distintas regiones o puntos de unión: una región polar, una región aromática y presenta una región hidrofóbica. Esta cavidad presenta una forma de Y, de tal modo que los compuestos afines a éste receptor toman esta misma conformación dentro del sitio de unión.

Región polar: presenta aminoácidos como: His-449, Tyr-473, His-323 y Ser-289 mismos que a menudo forman puentes de hidrógeno con los ligandos. La presencia de estas interacciones es crucial para la actividad agonista sobre PPAR- γ .

Región aromática: está conformado por aminoácidos como: Arg-288, Met-363 e Ile-323. Dichos residuos muestran interacciones π - π con los anillos aromáticos de los ligandos.

Región hidrofóbica: ésta presenta interacciones de tipo estérico.

Además el sitio activo de PPAR- γ presenta en su porción externa algunos residuos polares como: Arg-280, Glu-258 y Met-348.⁹¹

7.5.2.2 Acoplamiento molecular del compuesto ACB-1 sobre PPAR- γ

Se reagruparon los modos de unión con un RMSD= 0.5 Å obteniendo un conformero. Este presentó un puntaje de -8.38 kcal/mol siendo mejor que el mostrado por Tesaglitazar en la validación.

En las Figuras 56-57 se observa que el compuesto **ACB-1** tiene un modo de unión distinto al ligando cocrystalizado, ya que la porción ácida de la molécula no se internaliza en el sitio activo siendo la región hidrofóbica la que se posiciona dentro de la cavidad, lo cual no permite la interacción del ligando con los aminoácidos clave para la activación de este receptor. Lo anterior podría explicar los ensayos *in vitro* en donde se observó un aumento significativo de la expresión relativa de PPAR- γ , sin embargo no hubo un aumento de su producto de activación GLUT-4. Por otro lado, este compuesto muestra interacciones por puente de hidrógeno del protón del nitrógeno del anillo de tiazolidindiona con Arg 280 mismo que se encuentra en la porción externa del sitio activo de PPAR- γ . Asimismo se predice una interacción de puente de hidrógeno entre el carbonilo de la posición cuatro del anillo de tiazolidindiona y Cys 285.

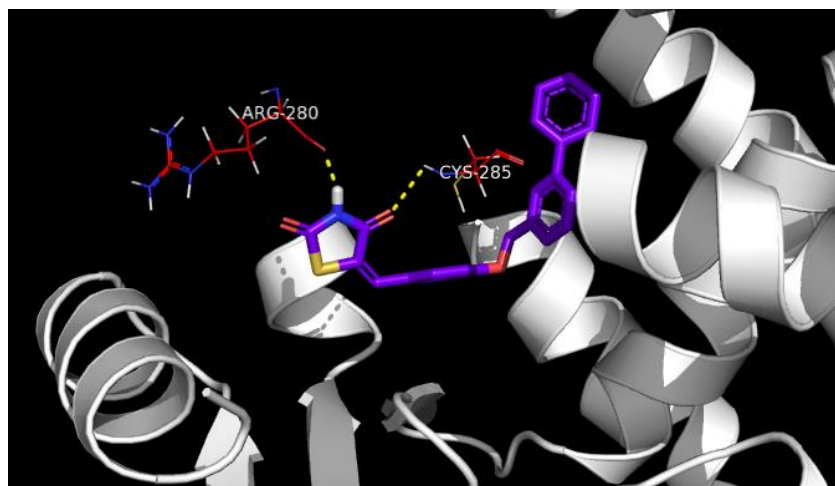


Figura 56. Visualización en tres dimensiones del compuesto **ACB-1** (morado) en la cavidad del sitio activo de PPAR- γ (blanco); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrógeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (Arg 280, Cys 285).

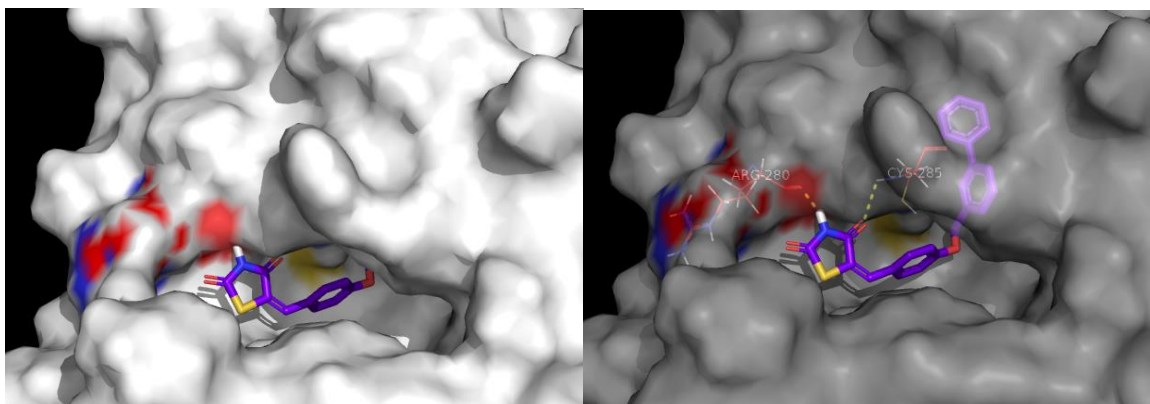


Figura 57. Modo de unión de **ACB-1** en el sitio activo de PPAR- γ (superficie en blanco) los aminoácidos mostrados son los que participan en las interacciones polares.

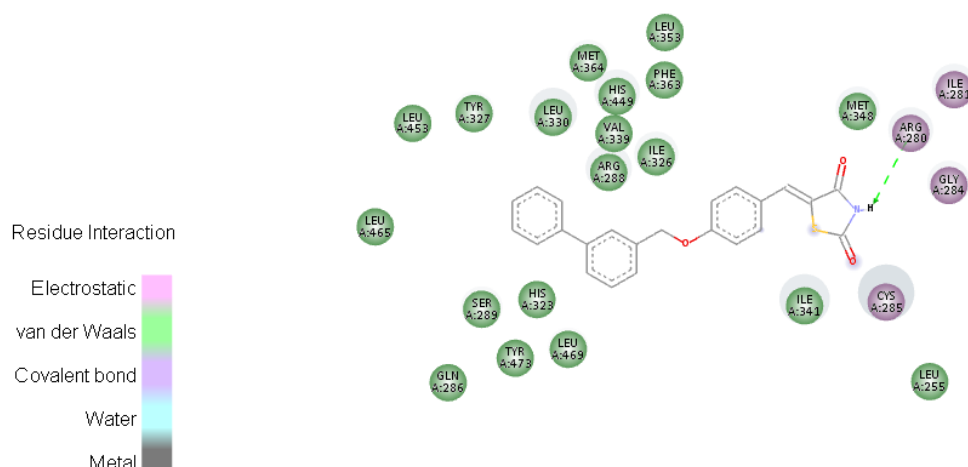


Figura 58. Visualización en dos dimensiones del compuesto **ACB-1** en el sitio activo de PPAR- γ ; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).

7.5.2.3 Acoplamiento molecular del compuesto **ACB-4** sobre PPAR- γ

Se reagruparon los modos de unión con un RMSD= 1 Å obteniendo un conformero. Éste presentó un puntaje de -6.48 kcal/mol.

El compuesto **ACB-4** mostró que conserva interacciones de puente de hidrógeno entre el oxígeno de la posición cuatro del anillo de tiazolidindiona y los residuos de aminoácidos Ser 289 e His 323, las cuales son interacciones clave para la actividad agonista sobre PPAR- γ (Figura 59).

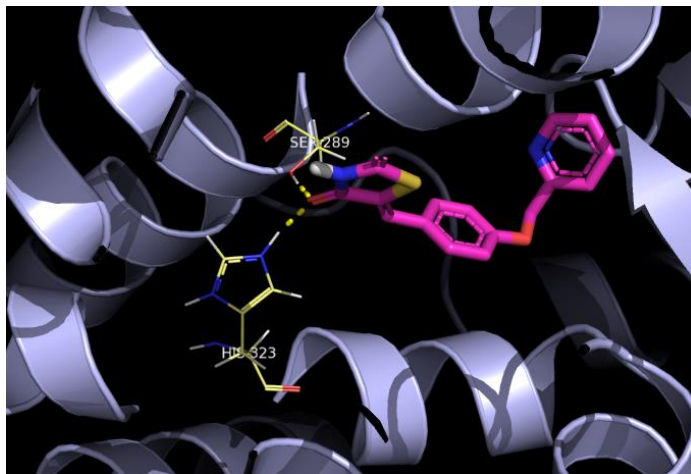


Figura 59. Visualización en tres dimensiones del compuesto **ACB-4** (magenta) en la cavidad del sitio activo de PPAR- γ (blanco); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrógeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (His 323, Ser 289).

En la Figura 60 se muestra que el compuesto **ACB-4** (magenta) se internaliza a través de la porción ácida al sitio activo de PPAR- γ al igual que Tesaglitazar e interacciona con aminoácidos necesarios para la activación de este receptor.

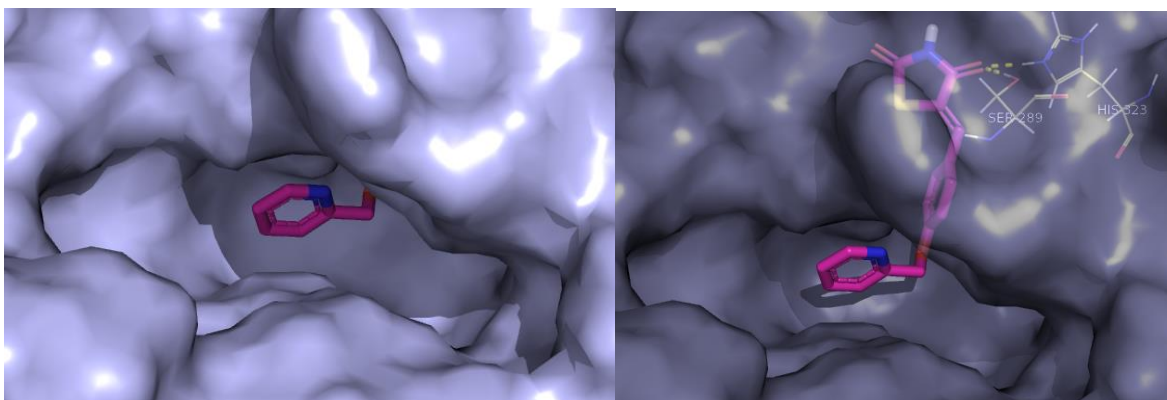


Figura 60. Modo de unión de **ACB-4** en el sitio activo de PPAR- γ (superficie en blanco) los aminoácidos mostrados son los que participan en las interacciones polares.

En el diagrama de interacción 2D (Figura 61) se observa una interacción de tipo π - π del nitrógeno del anillo de piridina de **ACB-4** con Cys 285, el cual forma parte de las interacciones del ligando co-cristalizado de este receptor. Del mismo modo en este diagrama se muestra una interacción de tipo puente de hidrógeno entre el azufre del anillo de tiazolidindiona con His 449, la cual no se observaba en la visualización en 3D (Figura 60).

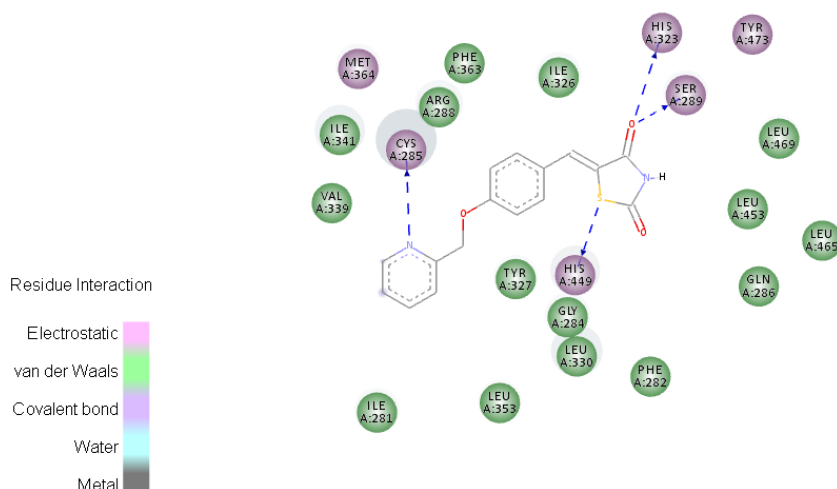


Figura 61. Visualización en dos dimensiones del compuesto **ACB-4** en el sitio activo de PPAR- γ ; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).

7.5.2.4 Acoplamiento molecular del compuesto **ACB-9** sobre PPAR- γ

Para la elección de éste conformero, se tomó en cuenta la similitud espacial del ligando co-cristalizado. Éste presentó un puntaje de -8.04 kcal/mol.

El compuesto **ACB-9** mostró interacciones de puente de hidrógeno entre el carboxilato y los residuos de aminoácidos Ser 289 e His 323, las cuales son interacciones clave para la actividad agonista sobre PPAR- γ (Figura 62), además se observa una interacción entre el carbonilo de este compuesto y Tyr 473.

Asimismo, se observó una interacción adicional con Ser-342, esta es característica de los agonistas parciales de PPAR- γ .¹¹⁸ Cabe mencionar que existen dos tipos de agonistas de este receptor totales y parciales, los agonistas totales se han relacionado con efectos adversos como aumento de peso, edema, insuficiencia cardíaca congestiva así como un aumento en el riesgo de fractura ósea.¹¹⁹ Por esta razón, se ha dado a la tarea de desarrollar agonistas parciales de PPAR- γ . Por otro lado esta interacción se ha observado en agonistas parciales de tipo ácido carboxílico tal y como el compuesto **ACB-9**.

En el diagrama de interacción 2D (Figura 63) se observa una interacción de tipo π - π del anillo de bifenilo de **ACB-9** con Gly 284.

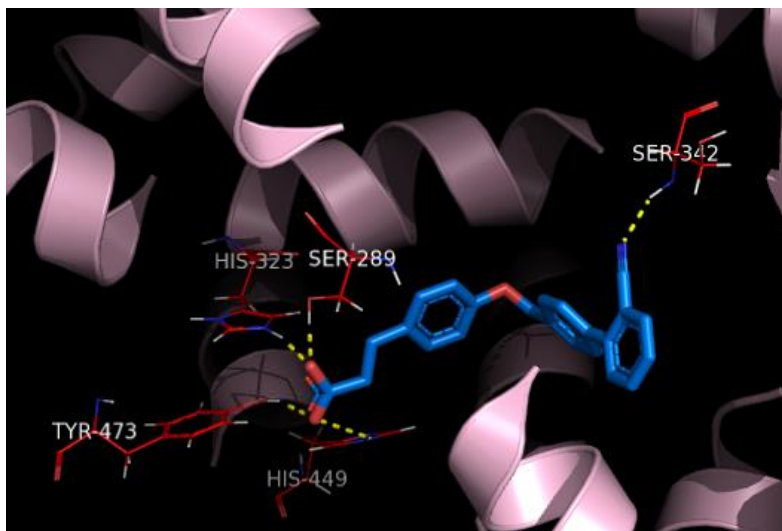


Figura 62. Visualización en tres dimensiones del compuesto **ACB-9** (azul) en la cavidad del sitio activo de PPAR- γ (blanco); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrógeno (amarillo) de los aminoácidos en rojo (His 323, Ser 289, Tyr 473, Ser 342).

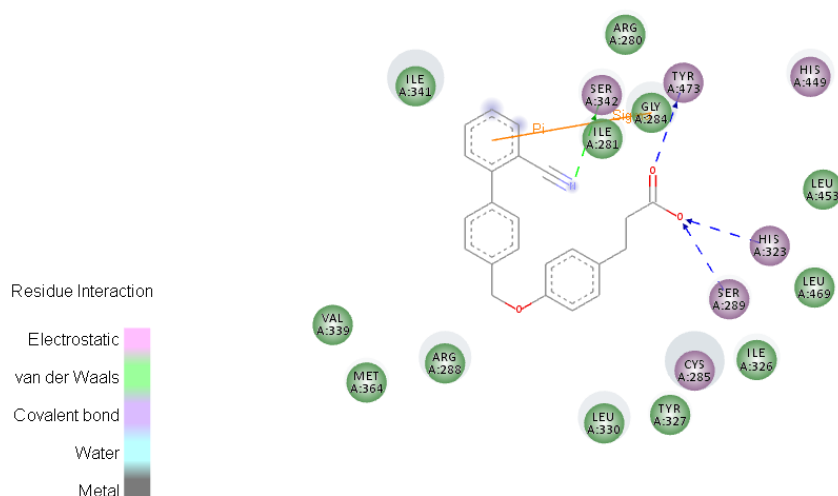


Figura 63. Visualización en dos dimensiones del compuesto **ACB-9** en el sitio activo de PPAR- γ ; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul) y π - π (línea en amarillo).

7.5.3 Acoplamiento molecular sobre la enzima PTP1B

7.5.3.1 Validación de acoplamiento molecular sobre la enzima PTP1B

En la Tabla 22 de la validación se muestra que se conservan todas las interacciones del ligando co-cristalizado. Con un puntaje de -7.42 kcal/mol y un RMSD de 1.79 Å.

Tabla 32. Validación de acoplamiento molecular del ligando cocrystalizado con ácido isoxazol carboxílico (PDB:1XBO) sobre PTP1B.

Interacciones con residuos de aminoácidos	Puntaje (kcal/mol)	RMSD (Å)
Arg 221, Phe 182, Gln 262, Arg 24, Ser 216	-7.42	1.79

En la validación del acoplamiento molecular con la enzima PTP1B y el ácido isoxazol carboxílico se muestra que se conservan enlaces de puentes de hidrógeno con residuos en el sitio catalítico como: Arg 221, Phe 182, Gln 262, Arg 24, Ser 216, Asp 181 y Ser 216 los cuales juegan un papel clave en el modo de unión del ligando cocrystalizado¹²⁰ (Figuras 64-65).

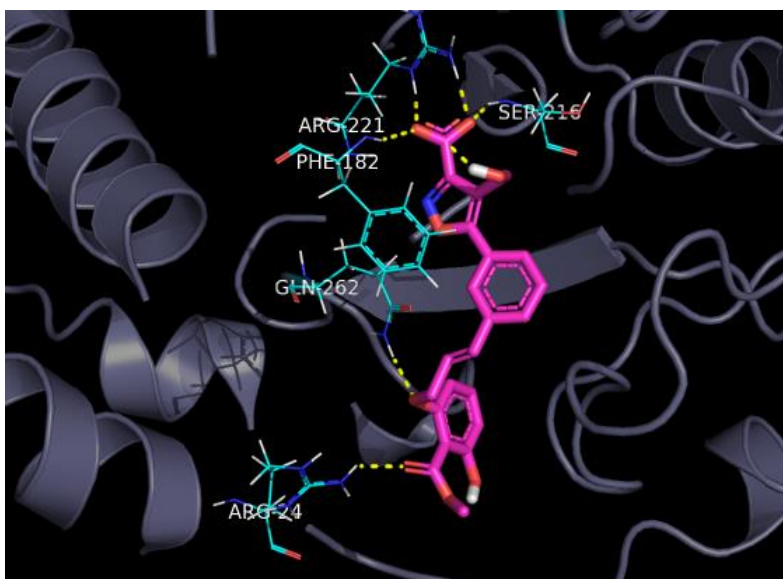


Figura 64. Visualización en tres dimensiones del ácido isoxazol carboxílico (magenta) en la cavidad del sitio catalítico de PTP1B (gris); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (Arg 221, Phe 182, Gln 262, Arg 24, Ser 216).

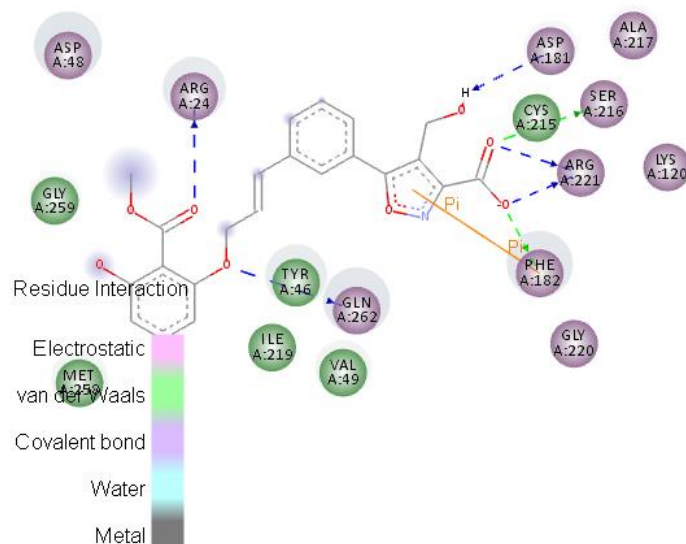


Figura 65. Visualización en dos dimensiones del ácido isoxazol carboxílico en el sitio catalítico de PTP-1B; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).

A modo de comprender mejor el modo de unión de los compuestos afines a la enzima PTP1B, a continuación se mencionan algunas características importantes del sitio catalítico de este blanco.

El sitio catalítico de PTP1B tiene un carácter altamente polar, en donde los aminoácidos Arg 221 y Asp 181 presentan interacciones de puentes de hidrógeno con los inhibidores de esta enzima; cabe mencionar que estos residuos forman parte de la triada catalítica de este blanco.⁶⁸ Por otro lado, esta enzima presenta una región hidrofóbica la cual normalmente está ocupada por la tirosina fosforilada (pTyr).

7.5.3.2 Acoplamiento molecular del compuesto ACB-1 sobre la enzima PTP1B.

En la Figura 66 se muestra el acoplamiento de **ACB-1**, donde se observa que se conservan interacciones importantes con residuos del sitio catalítico: Arg 24 y Ser 216. Además, se encontró una interacción nueva con Gln 266 la cual no está reportada con el ligando cristalográfico. Este compuesto reveló un puntaje de - 7.69 kcal/mol.

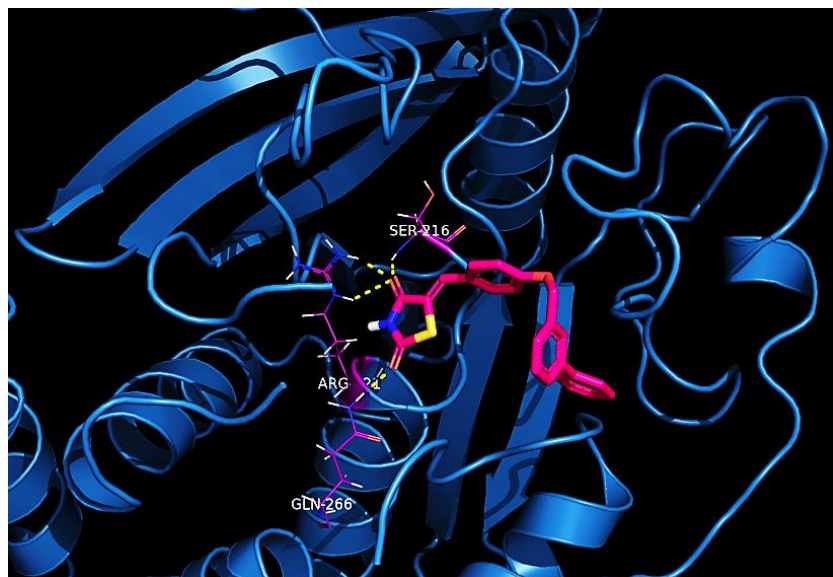


Figura 66. Visualización en tres dimensiones de **ACB-1** (rosa) en la cavidad del sitio catalítico de PTP1B (azul); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (Arg 221, Gln 266, Ser 216).

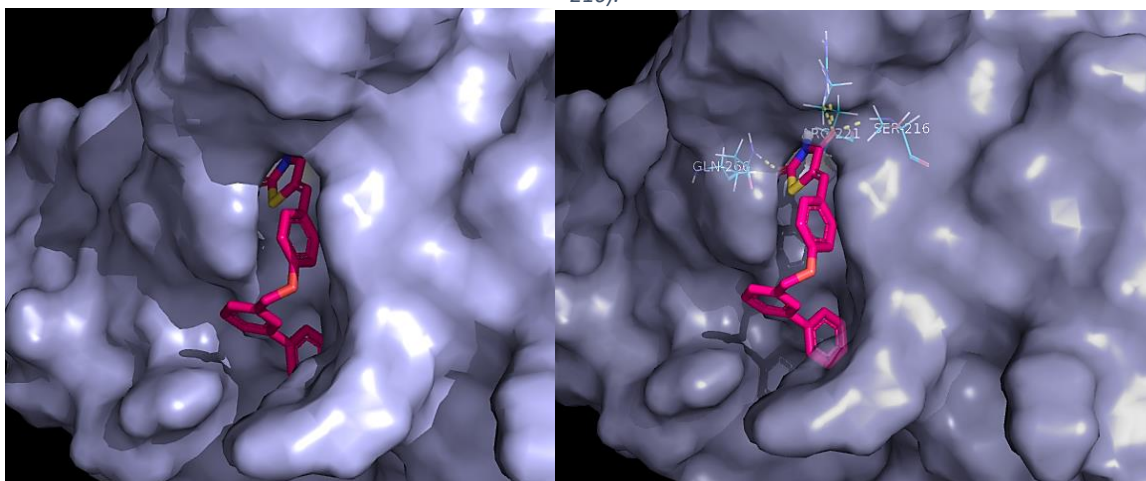


Figura 67. Modo de unión de **ACB-1** en el sitio catalítico de PTP1B (superficie en gris) los aminoácidos mostrados son los que participan en las interacciones polares.

En el diagrama de interacción 2D (Figura 68) se observa una nueva interacción de tipo $\pi-\pi$ entre el anillo C del bifenilo de **ACB-1** con Val 49; adicionalmente se observa una interacción $\pi-\pi$ entre el anillo aromático central y Tyr 46 la cual es parte de las interacciones del ligando cocrystalizado.

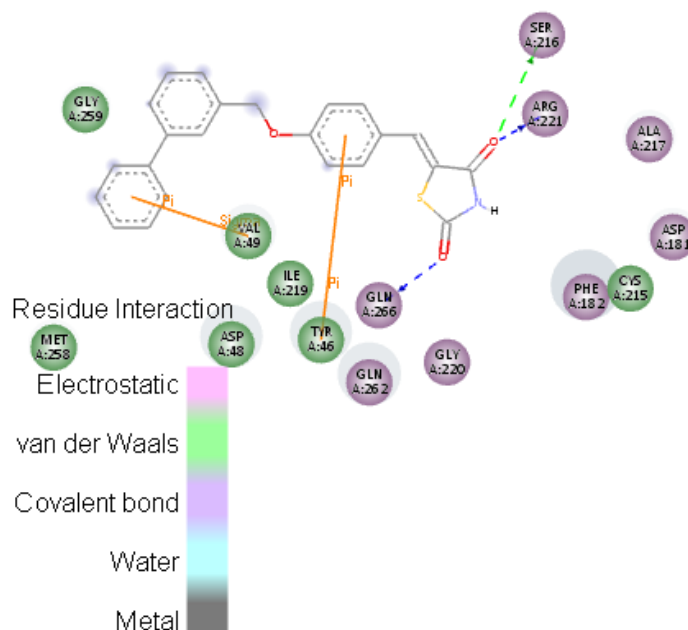


Figura 68. Visualización en dos dimensiones de **ACB-1** en el sitio catalítico de PTP1B; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).

7.5.3.3 Acoplamiento molecular del compuesto ACB-2 sobre la enzima PTP1B.

La Figura 69 muestra el acoplamiento de **ACB-2**, donde se observa que se conserva una interacción clave con Arg 221 ya que forma parte de la triada catalítica de esta enzima. Por otro lado, mostró una interacción de puente de hidrógeno con Ser 216 misma que es indispensable para la actividad. Además, se encontró una interacción nueva con Gln 266 la cual no está reportada con el ligando cristalográfico. Este compuesto reveló un puntaje de - 7.28 kcal/mol.

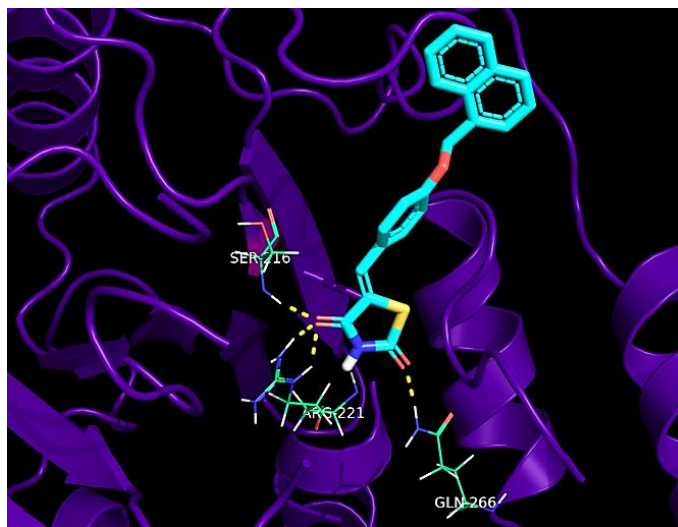


Figura 69. Visualización en tres dimensiones de **ACB-2** (rosa) en la cavidad del sitio catalítico de PTP1B (azul); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrógeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (Arg 221, Gln 266, Ser 216).

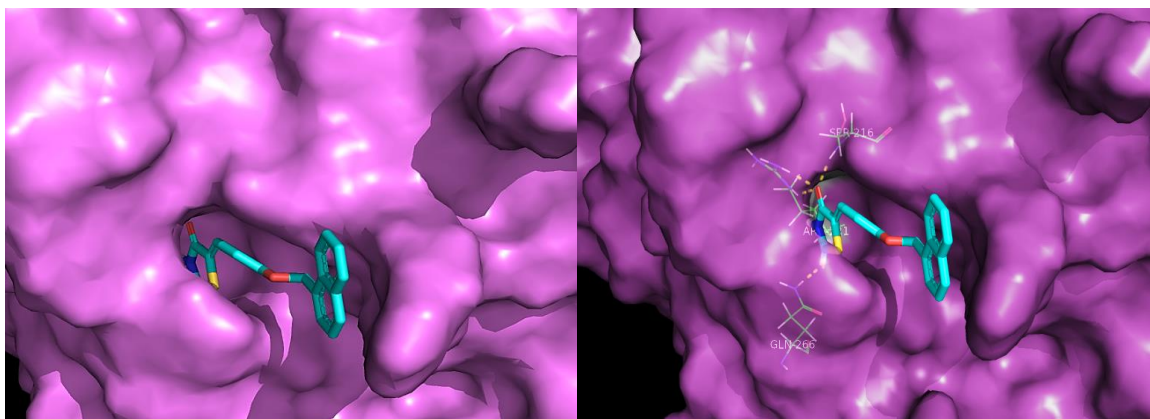


Figura 70. Modo de unión de **ACB-2** en el sitio catalítico de **PTP1B** (superficie en gris) los aminoácidos mostrados son los que participan en las interacciones polares.

En el diagrama de interacción 2D (Figura 71) se observa una interacción π - π entre el anillo aromático central y Tyr 46, la cual es parte de las interacciones del ligando cocrystalizado.

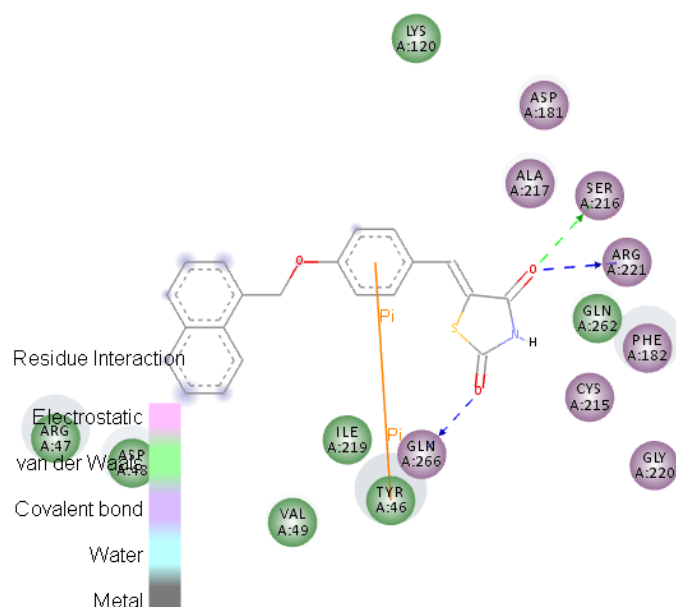


Figura 71. Visualización en dos dimensiones de **ACB-1** en el sitio catalítico de **PTP1B**; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).

7.5.4 Acoplamiento molecular sobre GPR40

7.5.4.1 Validación del acoplamiento molecular sobre GPR40

A continuación, se muestran los resultados (Tabla 33) de la validación en donde se observa que se conservan todas las interacciones del ligando cocrystalizado. Arrojando un puntaje de -9.11 kcal/mol y un RMSD de 1.47 Å.

Tabla 33. Validación de acoplamiento molecular de ligando cocrystalizado TAK-875 (4PHU) sobre GPR40.

Interacciones con residuos de aminoácidos	Puntaje (kcal/mol)	RMSD (Å)
Arg 183, Arg 2258, Tyr 91 y Tyr 2240	-9.11	1.47

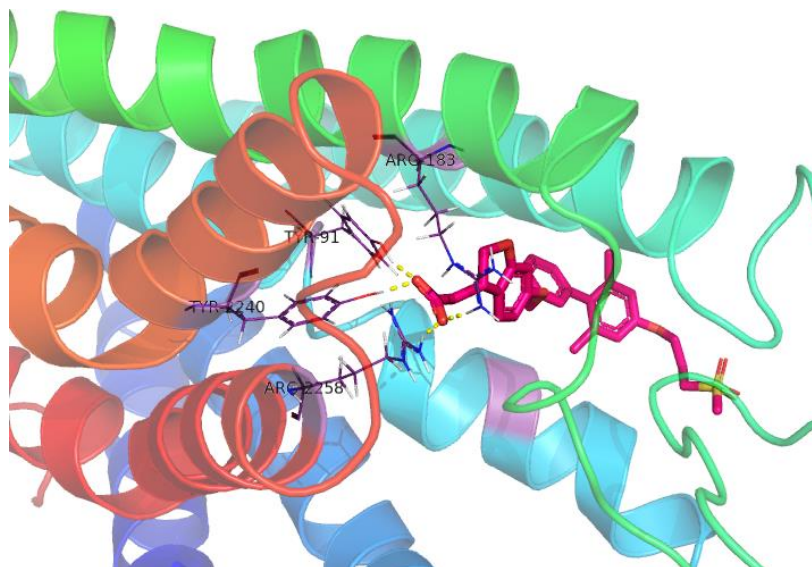


Figura 72. Visualización en tres dimensiones de **TAK-875** (rosa) en la cavidad del sitio activo con los siete dominios transmembranales (colores); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (Arg 183, Tyr 91, Arg 2258 Tyr 2240).

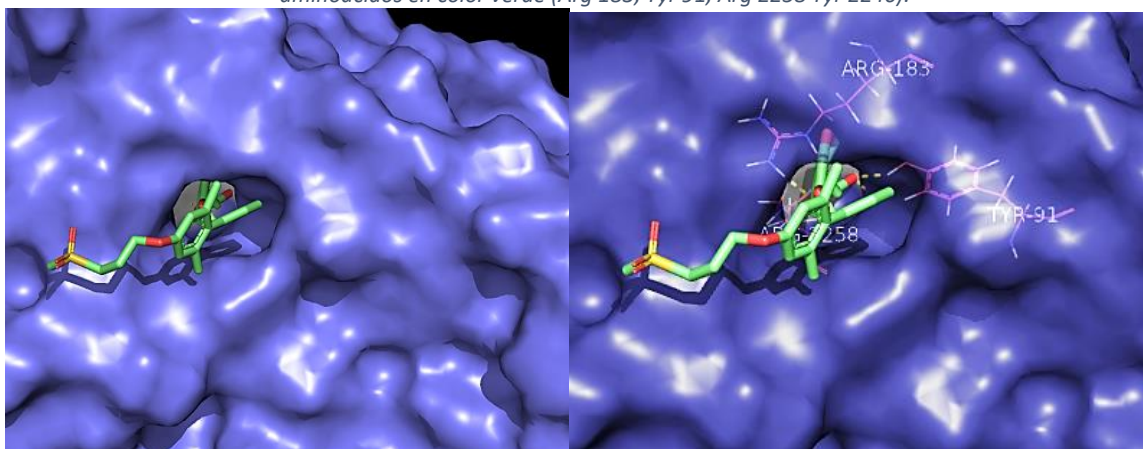


Figura 73. Modo de unión de **TAK-875** en el sitio activo de GPR40 (superficie en azul) los aminoácidos mostrados son los que participan en las interacciones polares.

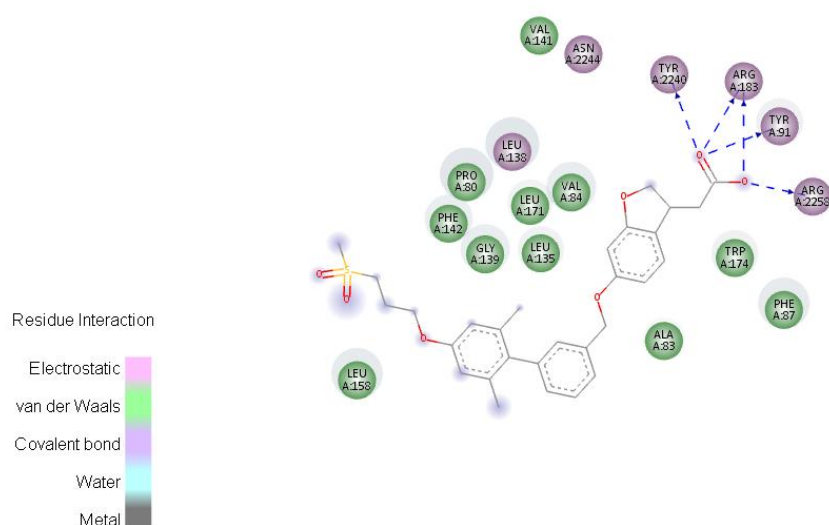


Figura 74. Visualización en dos dimensiones de **TAK-875** en el sitio activo de GPR40; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).

GPR40 tiene siete dominios transmembranales en donde presenta tres sitios de unión: el sitio ortostérico donde comúnmente se unen los ligandos endógenos, un sitio alostérico para agonistas parciales y un sitio alostérico adicional en donde se unen agonistas totales.¹²¹

La estructura cocrystalizada de GPR40 con **TAK-875** presenta interacciones clave con los residuos de Arg 183, Arg 2258, Tyr 91 y Tyr 2240. Por otro lado muestra interacciones con Trp 174 que está orientado perpendicular al plano del anillo de dihidroisobenzofurano de **TAK-875**.²⁶

El complejo de la estructura (PDB: 4PHU) revela que el modo de unión de **TAK-875** (agonista parcial) con el sitio activo de GPR40 es de forma alostérica y probablemente ocurre a través de la bicapa lipídica.

Acoplamiento molecular del compuesto **ACB-7** sobre GPR40.

Se reagruparon los modos de unión con un RMSD= 1 Å obteniendo un conformero. Este presentó un puntaje de -10.04 kcal/mol, mayor al presentado por el ligando cristalográfico.

El compuesto **ACB-7** mostró que conserva interacciones de puente de hidrógeno doble entre el carbonilo del ácido carboxílico y los residuos de aminoácidos Arg 2240, Tyr 91 las cuales son interacciones clave para la actividad agonista sobre GPR40. Del mismo modo se observó una interacción de tipo triple puente de hidrógeno reforzado entre el carboxilato

y Arg 2258, Tyr 2240 y Arg 183 esto podría estar asociado a la actividad biológica mostrada por **ACB-7** (Figura 75). Estos resultados correlacionan con el ensayo *in vitro* en donde **ACB-7** reveló una CI_{50} de 0.075 μ M siendo el más activo de la serie.

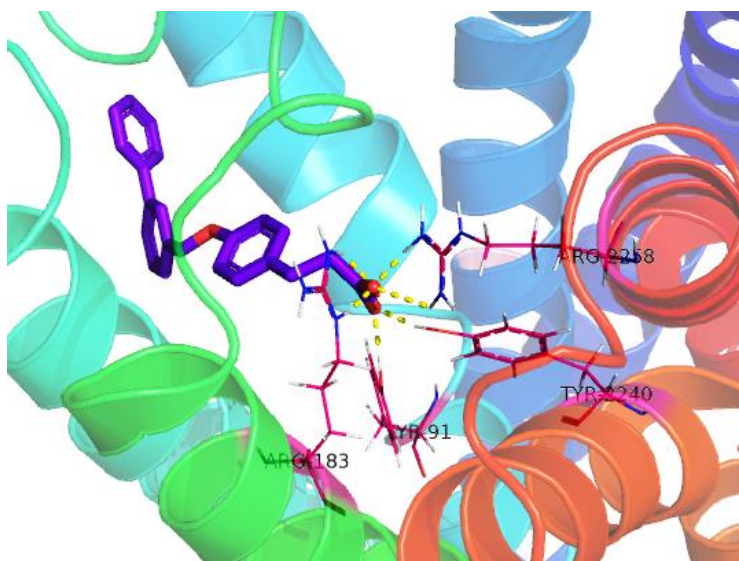


Figura 75. Visualización en tres dimensiones de **ACB-7** (morado) en la cavidad del sitio activo con los siete dominios transmembranales (colores); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (Arg 183, Tyr 91, Arg 2258 Tyr 2240).

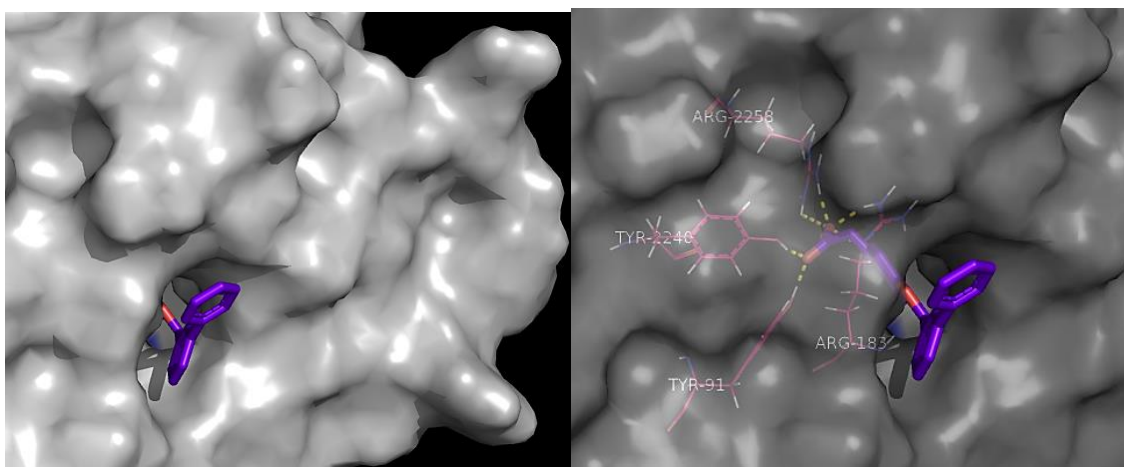


Figura 76. Modo de unión de **ACB-7** en el sitio activo de GPR40 (superficie en gris) los aminoácidos mostrados son los que participan en las interacciones polares.

En el diagrama en dos dimensiones (Figura 77) se observa que el compuesto **ACB-7** presenta interacciones adicionales de tipo π - π entre el anillo aromático central y entre el anillo A del bifenilo con Phe 142. Estas interacciones extras podrían reforzar la interacción del compuesto **ACB-7** con el sitio de unión de GPR40.

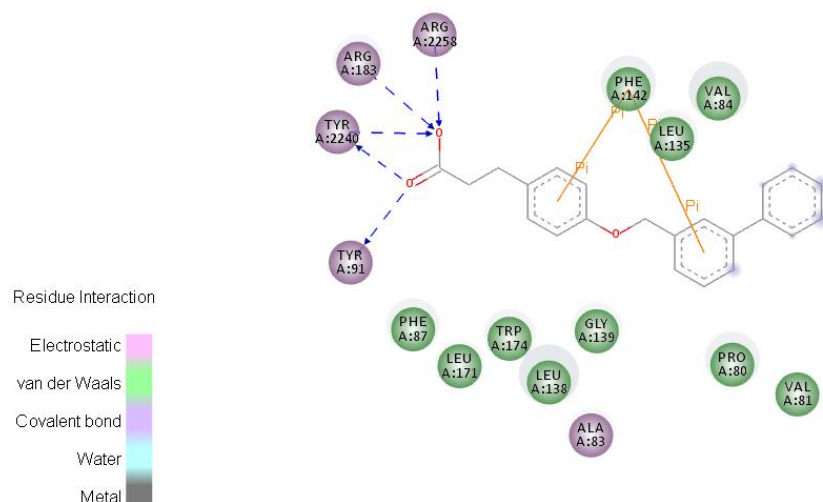


Figura 77. Visualización en dos dimensiones de **ACB-7** en el sitio activo de GPR40; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π (línea en amarillo).

Acoplamiento molecular del compuesto **ACB-8** sobre GPR40.

Se reagruparon los modos de unión con un RMSD= 0.5 Å obteniendo un conformero. Este presentó un puntaje de -9.77 kcal/mol.

En la Figura 78 el compuesto **ACB-8** mostró que conserva interacciones de puente de hidrógeno doble entre el carbonilo del ácido carboxílico y los residuos de aminoácidos Arg 2258 y Arg 183. Del mismo modo se observó una interacción de tipo doble puente de hidrógeno reforzado entre el carboxilato y Tyr 91 y Tyr 2240.

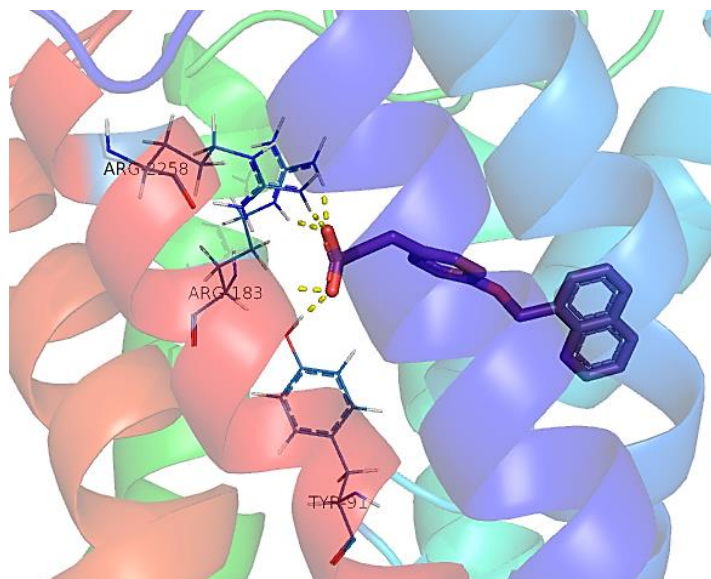


Figura 78. Visualización en tres dimensiones de **ACB-8** (azul) en la cavidad del sitio activo con los siete dominios transmembranales (colores); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (Arg 183, Tyr 91, Arg 2258 Tyr 2240).

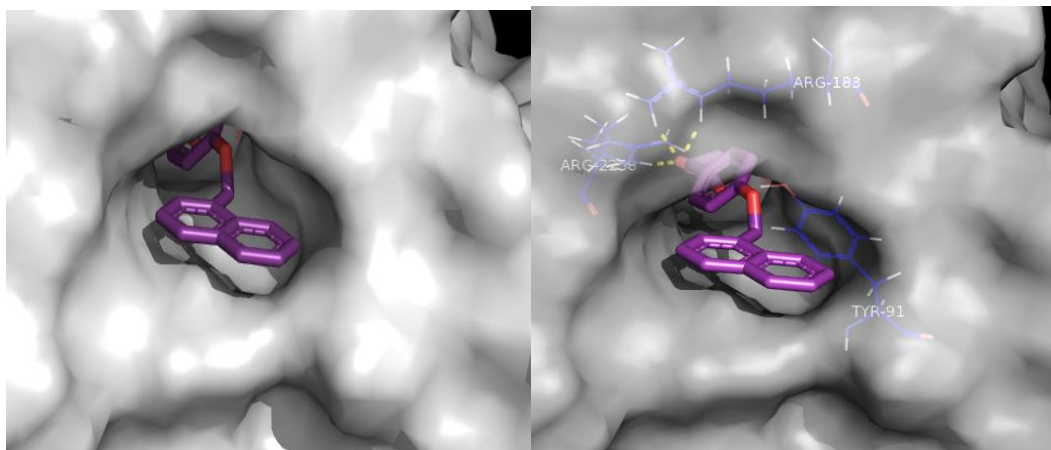


Figura 79. Modo de unión de **ACB-8** en el sitio activo de GPR40 (superficie en gris) los aminoácidos mostrados son los que participan en las interacciones polares.

En el diagrama en dos dimensiones (Figura 79) se observa que el compuesto **ACB-8** presenta interacciones adicionales de tipo π - π entre el anillo aromático central con Phe 142. Por otra parte, se muestra una interacción π - σ entre el anillo de naftaleno con Val84 y Trp 174. Estas interacciones extras podrían reforzar la interacción del compuesto **ACB-8** con el sitio activo de GPR40, ya que no se muestran con el ligando cristalográfico.

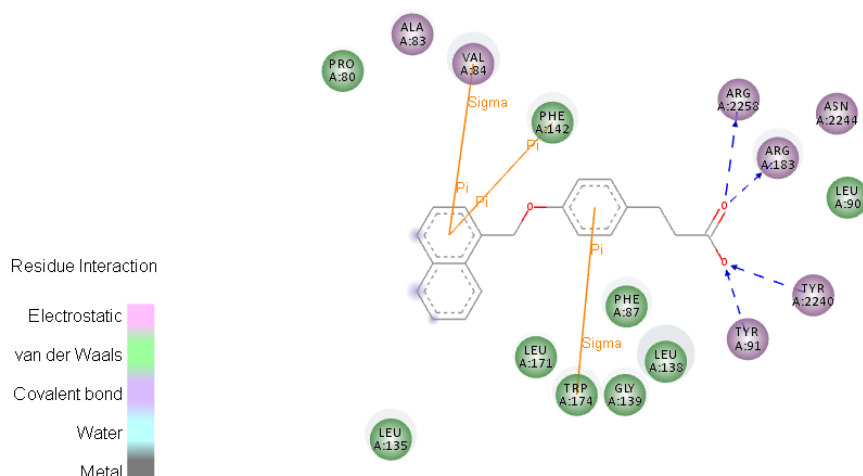


Figura 80. Visualización en dos dimensiones de **ACB-8** en el sitio activo de GPR40; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π , π - σ (línea en amarillo).

Acoplamiento molecular del compuesto **ACB-9** sobre GPR40.

Se reagruparon los modos de unión con un RMSD= 1 Å obteniendo un conformero. Éste presentó un puntaje de -9.15 kcal/mol.

El compuesto **ACB-9** (Figura 83) mostró que conserva interacciones de puente de hidrógeno doble entre el carbonilo del ácido carboxílico y los residuos de aminoácidos Arg 2240, Tyr 91 las cuales son interacciones clave para la actividad agonista sobre GPR40. Del mismo modo se observó una interacción de tipo triple puente de hidrógeno reforzado entre el carboxilato y Arg 2258, Tyr 2240 y Arg 183.

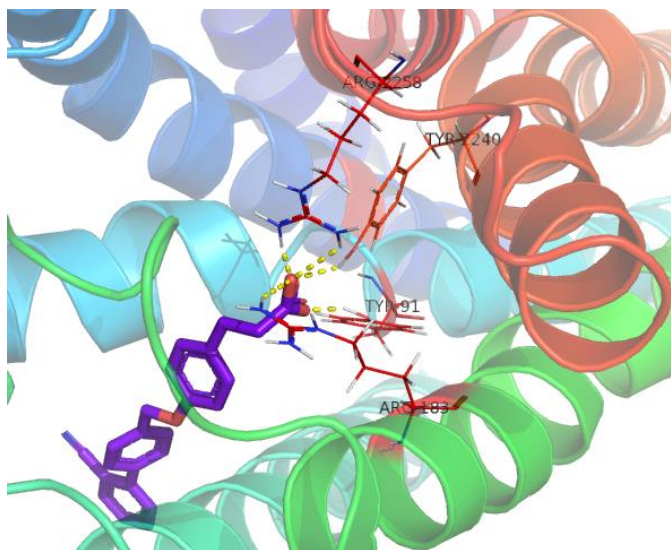


Figura 81. Visualización en tres dimensiones de **ACB-9** (morado) en la cavidad del sitio activo con los siete dominios transmembranales (colores); se aprecian las interacciones polares por puentes de hidrogeno (amarillo) de los aminoácidos en color verde (Arg 183, Tyr 91, Arg 2258 Tyr 2240).

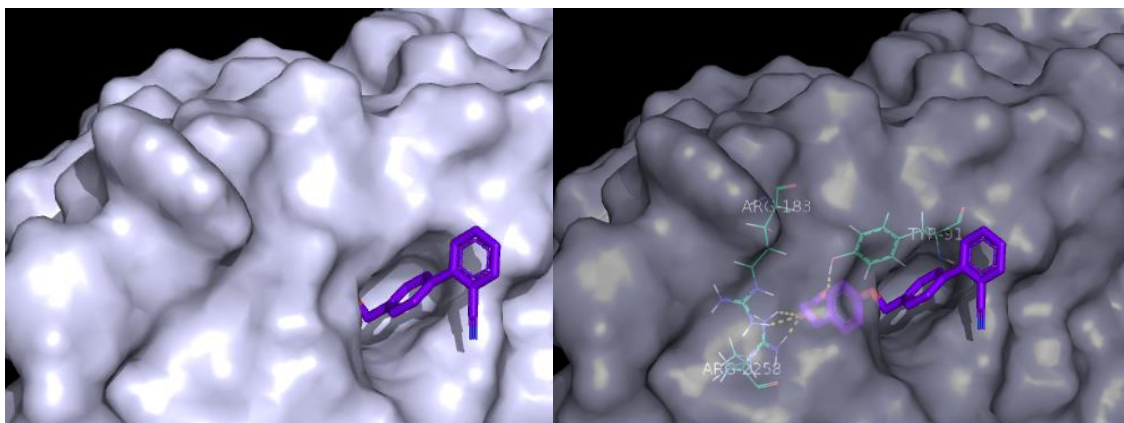


Figura 82. Modo de unión de **ACB-9** en el sitio activo de GPR40 (superficie en gris) los aminoácidos mostrados son los que participan en las interacciones polares.

En el diagrama en dos dimensiones (Figura 83) se observa que el compuesto **ACB-9** presenta interacciones adicionales de tipo π - π entre el anillo aromático central y Phe 142. Por otra parte se muestra un par de interacciones π - σ con Phe 187 y Phe 142.

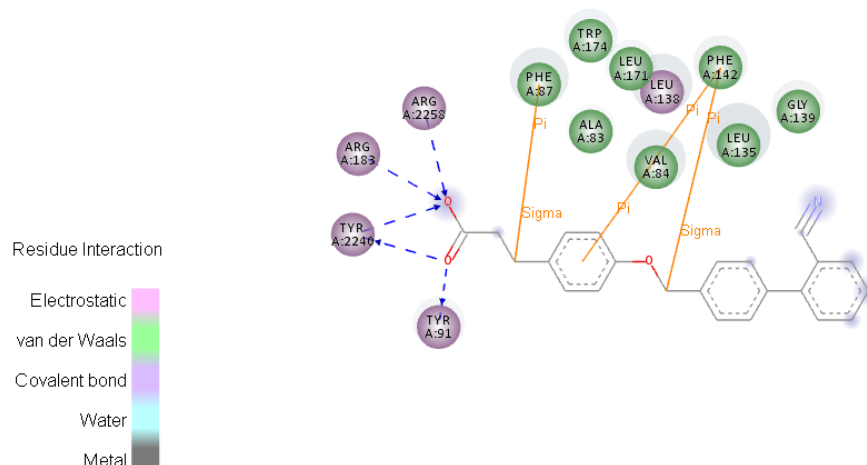


Figura 83. Visualización en dos dimensiones de **ACB-9** en el sitio activo de GPR40; se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde) y π - π , π - σ (línea en amarillo).

Con base en lo anterior, se encontró una correlación entre los ensayos *in vitro* sobre GPR40 y el acoplamiento molecular, ya que el compuesto **ACB-7** (-10.04 kcal/mol, CE_{50} = 0.0755 μ M) tuvo la mejor energía de unión calculada con respecto a **ACB-8** (-9.77 kcal/mol, CE_{50} = 0.648 μ M) y **ACB-9** (-9.15 kcal/mol, CE_{50} =0.797 μ M).

8. CONCLUSIONES

- Los compuestos **ACB-1**, **ACB-4**, **ACB-5**, **ACB-6**, **ACB-7**, y **ACB-9** mostraron los mejores perfiles de actividad biológica, así como propiedades ADMET, a través del análisis de consenso farmacológico.
- El compuesto de tipo tiazolidindiona **ACB-6** con el sustituyente trifluoroetoxilo de la posición 4 (**OCH₂-CF₃**) tuvo el mejor efecto inhibitorio sobre aldosa reductasa.
- Los compuestos de tipo tiazolidindiona **ACB-1** y **ACB-4** y los ácidos fenilpropanoicos **ACB-8** y **ACB-9** mostraron un aumento significativo de la expresión relativa del receptor PPAR- γ .
- En el ensayo de inhibición sobre PTP1B los compuestos de tipo tiazolidindiona **ACB-1-3** mostraron una CI_{50} en el bajo orden micromolar (*hit*) frente a esta enzima.
- Los compuestos de tipo ácido fenilpropanoico **ACB-7-9** mostraron la mejor actividad sobre GPR40, colocándose como compuestos líderes.
- Los compuestos **ACB-1**, **ACB-4**, **ACB-8** y **ACB-9** mostraron una disminución significativa de la glucemia *in vivo*.
- Los compuestos **ACB-1** y **ACB-7-8** mostraron efecto polifarmacológico en los cálculos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Por lo tanto, estas moléculas pueden servir de base para el desarrollo de nuevas entidades químicas para el tratamiento experimental de DM2 con diversos mecanismos de acción.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar la DE_{50} de los compuestos más activos.
- Determinar las propiedades ADMET de los compuestos más activos.
- Caracterizar los mecanismos de acción de la actividad antidiabética mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

10. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Torres Arreola Laura del Pilar, Gil Velazquez Luisa Estela, Sil Acosta Maria Juana, Dominguez Sanchez Elia, Parrilla Ortiz Juan Ismael, S. H. S. P. *Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 en el primer nivel de atención.*; 2014.
- (2)
- (3) *Diabetes atlas de la fid*; 2017.
- (4) Negoro, N.; Sasaki, S.; Mikami, S.; Ito, M.; Suzuki, M.; Tsujihata, Y.; Ito, R.; Harada, A.; Takeuchi, K.; Suzuki, N.; Miyazaki, J.; Santou, T.; Odani, T.; Kanzaki, N.; Funami, M.; Tanaka, T.; Kogame, A.; Matsunaga, S.; Yasuma, T.; Momose, Y. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, 1 (6), 290–294.
- (5) Christiansen, E.; Due-Hansen, M. E.; Urban, C.; Grundmann, M.; Schröder, R.; Hudson, B. D.; Milligan, G.; Cawthorne, M. a; Kostenis, E.; Kassack, M. U.; Ulven, T. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (14), 6624–6628.
- (6) Yamashima, T. *Prog. Lipid Res.* **2015**, 58, 40–50.
- (7) Defossa, E.; Wagner, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24 (14), 2991–3000.
- (8) Modulators, G. P. R. F.; Medina, J. C.; Houze, J. B. **2008**, 43 (8), 75–85.
- (9) Navarrete-Vazquez, G.; Ramírez-Martínez, M.; Estrada-Soto, S.; Nava-Zuazo, C.; Paoli, P.; Camici, G.; Escalante-García, J.; Medina-Franco, J. L.; López-Vallejo, F.; Ortiz-Andrade, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 53, 346–355.
- (10) Ottanà, R.; Maccari, R.; Ciurleo, R.; Paoli, P.; Jacomelli, M.; Manao, G.; Camici, G.; Laggner, C.; Langer, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17 (5), 1928–1937.
- (11) Ottanà, R.; Maccari, R.; Mortier, J.; Caselli, A.; Amuso, S.; Camici, G.; Rotondo, A.; Wolber, G.; Paoli, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 71, 112–127.
- (12) Study, D.; Cheon, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**.
- (13) Maccari, R. **2015**.
- (14) Biology, C.; Ramana, K. V; Srivastava, S. K. **2010**, 42, 17–20.
- (15) Ottanà, R.; Maccari, R.; Giglio, M.; Del, A.; Cappiello, M.; Mura, U.; Cosconati, S.; Marinelli, L.; Novellino, E.; Sartini, S.; La, C.; Da, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46 (7), 2797–2806.
- (16) Maccari, R.; Maria, R.; Ottanà, R.; Rocchiccioli, M.; Marrazzo, A.; Cardile, V.; Carol, A.; Graziano, E.; Amodeo, P.; Mura, U.; Del, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 81, 1–14.
- (17) Sambasivarao, S. V; Soni, L. K.; Gupta, A. K.; Hanumantharao, P.; Kaskhedikar, S. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16 (3), 512–520.
- (18) No Title American Diabetes Association <http://www.diabetes.org/es/informacion-basica-de-la-diabetes/diabetes-tipo-2/?loc=util-header-es>.
- (19) Prabhakar, P. K.; Kumar, A.; Doble, M. *Phytomedicine* **2014**, 21 (2), 123–130.
- (20) Gutierrez-Lara Erika. Diseño y síntesis de análogos de Metformina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2014.
- (21) Leibowitz, G.; Kaiser, N.; Cerasi, E. *J. Diabetes Investig.* **2011**, 2 (2), 82–91.
- (22) Cerf, M. E. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2013**, 4 (MAR), 1–12.
- (23) Inzucchi, S. E. **2012**, 542–550.
- (24) Oficial, N.; Nom, M.; Nacional, E.; Mexicanos, E. U.; Avila, M. H.; Nacional, C.; Org, L.; Federal, L.; Administrativo, P.; General, L.; Federal, L.; Federal, L.; Interior, R.; Oficial, D.; Oficial, N.; Nom, M.; Prevencion, P. L. A.; La, C. D. E.; Mellitus, D.; Que, C.; Federal, L.; Nacional, C.; Epidemiol, V.; Nacional, C.; Preventivos, P.; Nacional, C.; Mexicana, N. O.; Nacional, C.; Federal, L.; Oficial, D.; Nacional, C.; Oficial, D.; Federal, L.; Nacional, C.; Oficial, N.; Nom, M.; En, P.; Mexicana, N. O.; Nacional, C.; Preventivos, P.; Direcci, E.; Nacional, S. C.; Direcci, S. R.; Direcci, S.; Comisi, S.; Nacionales, I.; Zubir, S.; Ch, I.; General, H.; Nacional, C.; Adjunta, G.; Naval, S.; Preventiva, M. **2016**, 1–35.
- (25) Almanza-pérez, J. C.; Blancas-flores, G.; García-macedo, R.; Javier, F.; Miguel, A. **2008**, 144 (6), 535–

- 542.
- (26) Vieira-Potter, V. J. *Cell. Microbiol.* **2014**, 16 (10), 1484–1492.
- (27) Kusminski, C. M.; Bickel, P. E.; Scherer, P. E. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, 15 (9), 639–660.
- (28) Blancas-flores, G.; Almanza-pérez, J. C.; López-roa, R. I.; Alarcón-aguilar, F. J.; García-macedo, R.; Cruz, M. 3–12.
- (29) Esser, N.; Legrand-Poels, S.; Piette, J.; Scheen, A. J.; Paquot, N. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2014**, 105 (2), 141–150.
- (30) Sun, K.; Kusminski, C. C. M.; Scherer, P. E. *J. Clin. ...* **2011**, 121 (6), 2094–2101.
- (31) Khalil, H. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **2017**, 11, S133–S139.
- (32) Schwartz, S. S.; Epstein, S.; Corkey, B. E.; Grant, S. F. A.; Iii, J. R. G.; Aguilar, R. B.; Herman, M. E. **2017**, 28 (9), 645–655.
- (33) Huang, D.; Refaat, M.; Mohammedi, K.; Jayyousi, A.; Al Suwaidi, J.; Abi Khalil, C. *Biomed Res. Int.* **2017**, 2017.
- (34) Kumar, A.; Kumar, S.; Kumar, A. *Pharmacol. Reports* **2017**, 69 (5), 959–970.
- (35) Kim, J.; Yang, G.; Kim, Y.; Kim, J.; Ha, J. *Exp. Mol. Med.* **2016**, 48 (4), e224-12.
- (36) Upadhyay, J.; Polyzos, S. A.; Perakakis, N.; Thakkar, B.; Paschou, S. A.; Katsiki, N.; Underwood, P.; Park, K.; Seufert, J.; Seok, E.; Sternthal, E.; Karagiannis, A.; Mantzoros, C. S. *Metabolism* **2017**, 78, 13–42.
- (37) Zhou, G.; Myers, R.; Li, Y.; Chen, Y.; Shen, X.; Fenyk-melody, J.; Wu, M.; Ventre, J.; Doebber, T.; Fujii, N.; Musi, N.; Hirshman, M. F.; Goodyear, L. J.; Moller, D. E. *J. Clin. Invest.* **2001**, 108 (8), 1167–1174.
- (38) Khunti, K.; Chatterjee, S.; Gerstein, H. C.; Zoungas, S.; Davies, M. J. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2018**, 8587 (18).
- (39) Blickl, J. F. **2006**, 113–120.
- (40) Rosenbaum, P. R. *Causal Inference* **2016**, 25–39.
- (41) Standl, E.; Schnell, O. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* **2012**, 9 (3), 163–169.
- (42) Tahrani, A. A.; Barnett, A. H.; Bailey, C. J. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2016**, 12 (10), 566–592.
- (43) Claudia, B.; Araceli, B. M.; León, L. *Rev. Argent. Endocrinol. Metab.* **2010**, 47 (3), 39–54.
- (44) Di Girolamo, G.; Peña, A. L. T.; Pérez, H. E. T. *Med. Interna Mex.* **2008**, 24 (2), 142–147.
- (45) Food and Drug Administration (FDA) <https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm446852.htm>.
- (46) Cefalu, W. T.; Riddle, M. C. *Diabetes Care* **2015**, 38 (3), 352–354.
- (47) Nanjan, M. J.; Mohammed, M.; Prashantha Kumar, B. R.; Chandrasekar, M. J. N. *Bioorg. Chem.* **2018**, 77, 548–567.
- (48) Mughal, A.; Kumar, D.; Vikram, A. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, 768, 217–225.
- (49) Huang, T. H. W.; Teoh, A. W.; Lin, B. L.; Lin, D. S. H.; Roufogalis, B. *Pharmacol. Res.* **2009**, 60 (3), 195–206.
- (50) Balakumar, P.; Rose, M.; Ganti, S. S.; Krishan, P.; Singh, M. *Pharmacol. Res.* **2007**, 56 (2), 91–98.
- (51) Stafylas, P. C.; Sarafidis, P. a; Lasaridis, A. N. *Int. J. Cardiol.* **2009**, 131 (3), 298–304.
- (52) Lee, S. H.; Sung, M. J.; Hahn, S. J.; Kim, J.; Min, G.; Jo, S.-H.; Choe, H.; Choi, B. H. *Arch. Pharm. Res.* **2012**, 35 (9), 1655–1664.
- (53) Lau, A.; Frcpc, W. H. *Can. J. Diabetes* **2007**, 31 (4), 378–383.
- (54) Wahli, W.; Michalik, L. *Trends Endocrinol. Metab.* **2012**, 23 (7), 351–363.
- (55) Lefterova, M. I.; Haakonsson, A. K.; Lazar, M. a.; Mandrup, S. *Trends Endocrinol. Metab.* **2014**, 25 (6), 293–302.
- (56) Lucosa, T. R. D. E. L. A. G. **2007**, 26 (2), 49–57.
- (57) Ricote, M.; Glass, C. K. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1771 (8), 926–935.

- (58) Christodoulides, C.; Vidal-Puig, A. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2010**, *318* (1–2), 61–68.
- (59) Janani, C.; Ranjitha Kumari, B. D. *Diabetes Metab. Syndr.* **2015**, *9* (1), 46–50.
- (60) Tripathi, A. C.; Gupta, S. J.; Fatima, G. N.; Sonar, P. K.; Verma, A.; Saraf, S. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *72*, 52–77.
- (61) Cariou, B.; Zaïr, Y.; Staels, B.; Bruckert, E. *Diabetes Care* **2011**, *34* (9), 2008–2014.
- (62) Pan, D. S.; Wang, W.; Liu, N. S.; Yang, Q. J.; Zhang, K.; Zhu, J. Z.; Shan, S.; Li, Z. Bin; Ning, Z. Q.; Huang, L.; Lu, X. P. *PPAR Res.* **2017**, *2017*.
- (63) Wang, N.; Verna, L.; Chen, N.-G.; Chen, J.; Li, H.; Forman, B. M.; Stemerman, M. B. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (37), 34176–34181.
- (64) Maekawa, T.; Jin, W.; Ishii, S. *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30* (3), 613–625.
- (65) Wang, S.; Awad, K. S.; Elinoff, J. M.; Dougherty, E. J.; Ferreyra, G. A.; Wang, J. Y.; Cai, R.; Sun, J.; Ptasinska, A.; Danner, R. L. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (32), 19544–19557.
- (66) Mancini, A. D.; Poitout, V. *Diabetes, Obes. Metab.* **2015**, *17* (7), 622–629.
- (67) Jaimes, M.-L. G. "Diseño y Síntesis de Derivados del Ácido 2.(4-hidroxifenoxi)propiónico como Agentes para el Tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2," UAEM, 2016.
- (68) Chen, C.; Li, H.; Long, Y.-Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 5603–5612.
- (69) Khan, M. Z.; He, L. *Neuropharmacology* **2017**, *113*, 639–651.
- (70) Nishinaka, T.; Yamashita, T.; Nakamoto, K.; Kasuya, F.; Tokuyama, S. *J. Pharmacol. Sci.* **2014**, *125* (1), 112–115.
- (71) Kandimalla, R.; Thirumala, V.; Reddy, P. H. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2017**, *1863* (5), 1078–1089.
- (72) Milligan, G.; Alvarez-Curto, E.; Watterson, K. R.; Ulven, T.; Hudson, B. D. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172* (13), 3254–3265.
- (73) Proschak, E.; Heitel, P.; Kalinowsky, L.; Merk, D. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (13), 5235–5266.
- (74) Wang, X.; Zhao, T.; Yang, B.; Li, Z.; Cui, J.; Dai, Y.; Qiu, Q.; Qiang, H.; Huang, W.; Qian, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, No. December 2013.
- (75) Bakke, J.; Haj, F. G. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2015**, *37*, 58–65.
- (76) Cho, H. *Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) And Obesity*, 1st ed.; Elsevier Inc., 2013; Vol. 91.
- (77) Hale, A. J.; Hertog, J. Den. *Dev. Biol.* **2017**, *428* (2), 283–292.
- (78) Bernier, M. **2004**.
- (79) Bialy, L.; Waldmann, H. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44* (25), 3814–3839.
- (80) Ramírez-Espinosa, J. J.; Rios, M. Y.; López-Martínez, S.; López-Vallejo, F.; Medina-Franco, J. L.; Paoli, P.; Camici, G.; Navarrete-Vázquez, G.; Ortiz-Andrade, R.; Estrada-Soto, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46* (6), 2243–2251.
- (81) Verma, M.; Ji, S.; Chaudhary, A.; Garg, V. K. *Bioorg. Chem.* **2017**, *70*, 267–283.
- (82) Balestri, F.; Cappiello, M.; Moschini, R.; Rotondo, R.; Abate, M.; Del-corso, A.; Mura, U. *BBA - Gen. Subj.* **2015**, *1850* (11), 2329–2339.
- (83) Petrash, J. M.; Tarle, I.; Wilson, D. K.; Quioco, F. A. *Diabetes* **1994**, *43* (AUGUST), 955–959.
- (84) Hotta, N.; Akanuma, Y.; Kawamori, R.; Matsuoka, K.; Oka, Y.; Shichiri, M.; Toyota, T.; Nakashima, M.; Yoshimura, I.; Sakamoto, N.; Shigeta, Y. *Diabetes Care* **2006**, *29* (7), 1538–1544.
- (85) Hotta, N.; Kawamori, R.; Atsumi, Y.; Baba, M.; Kishikawa, H.; Nakamura, J.; Oikawa, S.; Yamada, N.; Yasuda, H.; Shigeta, Y. *Diabet. Med.* **2008**, *25* (7), 818–825.
- (86) Ramirez, M. A. and Borja, N. L. Ramirez, M. A. and Borja, N. L. *Pharmacotherapy* **2008**, *28*, 646–655.
- (87) L., C.; G., R.; M.C., G.; D., B.; Costantino, L.; Rastelli, G.; Gamberini, M. C.; Barlocco, D. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2000**, *10* (8), 1245–1262.
- (88) Jain, V. S.; Vora, D. K.; Ramaa, C. S. *Bioorganic Med. Chem.* **2013**, *21* (7), 1599–1620.
- (89) Ballatore, C.; Hurn, D. M.; Smith, A. B. *ChemMedChem* **2013**, *8* (3), 385–395.

- (90) Hidalgo-Figueroa, S.; Ramírez-Espinosa, J. J.; Estrada-Soto, S.; Almanza-Pérez, J. C.; Román-Ramos, R.; Alarcón-Aguilar, F. J.; Hernández-Rosado, J. V.; Moreno-Díaz, H.; Díaz-Coutiño, D.; Navarrete-Vázquez, G. *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81* (4), 474–483.
- (91) Hidalgo-Figueroa, S. "Diseño, Síntesis, bioevaluación y estudios de acoplamiento molecular de aza y tiazaheterociclos para el tratamiento experimental de la diabetes e hipertensión," Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2013.
- (92) Hara, T.; Kashihara, D.; Ichimura, A.; Kimura, I.; Tsujimoto, G.; Hirasawa, A. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841* (9), 1292–1300.
- (93) Cheng, F.; Li, W.; Zhou, Y.; Shen, J.; Wu, Z.; Liu, G.; Lee, P. W.; Tang, Y. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52* (11), 3099–3105.
- (94) Reddy, T. N.; Ravinder, M.; Bagul, P.; Ravikanti, K.; Bagul, C.; Nanubolu, J. B.; Srinivas, K.; Banerjee, S. K.; Rao, V. J. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *71*, 53–66.
- (95) Briscoe, C. P.; Peat, A. J.; McKeown, S. C.; Corbett, D. F.; Goetz, A. S.; Littleton, T. R.; McCoy, D. C.; Kenakin, T. P.; Andrews, J. L.; Ammala, C.; Fornwald, J. A.; Ignar, D. M.; Jenkinson, S. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *148* (5), 619–628.
- (96) Antonia, S.; Bekas, N.; Katsikoudi, A.; Tzakos, A. G.; Horacio, P. 655–663.
- (97) Almanza-Pérez, J. C.; Blancas-Flores, G.; García-Macedo, R.; Alarcón-Aguilar, F. J.; Cruza, M. *Gac. Med. Mex.* **2008**, *144* (6), 535–542.
- (98) Giacomán-Martínez, A. "Extractos de Hibiscus sabdariffa L., Psacallum decompositum (A. Gray) H. Rob and Bretell y Tilliandsia unsneoides L. como posibles agonistas duales de PPAR's," Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, 2015.
- (99) Masiello, P. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, *38* (5–6), 873–893.
- (100) Luo, J.; Swaminath, G.; Brown, S. P.; Zhang, J.; Guo, Q.; Chen, M.; Nguyen, K.; Tran, T.; Miao, L.; Dransfield, P. J.; Vimolratana, M.; Houze, J. B.; Wong, S.; Toteva, M.; Shan, B.; Li, F.; Zhuang, R.; Lin, D. C. H. *PLoS One* **2012**, *7* (10), 1–12.
- (101) Balestri, F.; Rotondo, R.; Moschini, R.; Pellegrino, M.; Cappiello, M.; Barracco, V.; Misuri, L.; Sorce, C.; Andreucci, A.; Del-corso, A.; Mura, U. **2016**, *1*, 1–11.
- (102) Balestri, F.; Cappiello, M.; Moschini, R.; Rotondo, R.; Buggiani, I.; Pelosi, P.; Mura, U.; Del-Corso, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *456* (4), 891–895.
- (103) Dutour, R.; Poirier, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *135*, 296–306.
- (104) Uppstad, H.; Øvrebo, S.; Haugen, A.; Mollerup, S. *Toxicol. Lett.* **2010**, *192* (2), 221–228.
- (105) Zünkler, B. J. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *112* (1), 12–37.
- (106) H. Kerns Edward, D. L. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*; 2008; Vol. XXXIII.
- (107) Vandenberg, J. I.; Perry, M. D.; Perrin, M. J.; Mann, S. A.; Ke, Y.; Hill, A. P. *Physiol. Rev.* **2012**, *92* (3), 1393–1478.
- (108) Sambuy, Y.; De Angelis, I.; Ranaldi, G.; Scarino, M. L.; Stamatii, A.; Zucco, F. *Cell Biol. Toxicol.* **2005**, *21* (1), 1–26.
- (109) Ferrec, E.; Chesne, C.; Artusson, P.; Brayden, D.; Fabre, G.; Gires, P.; Guillou, F.; Rousset, M. *Atla* **2001**, *29*, 649–668.
- (110) Elte, J. W. F.; Blicklé, J. F. *Eur. J. Intern. Med.* **2011**.
- (111) Tolman, K. G.; Chandramouli, J. **2003**, *7*, 369–379.
- (112) Deiluiis, J. A. *Int. J. Obes.* **2016**, *40* (1), 88–101.
- (113) Xu, H. E.; Lambert, M. H.; Montana, V. G.; Plunket, K. D.; Moore, L. B.; Collins, J. L.; Oplinger, J. A.; Kliewer, S. A.; Gampe, R. T.; Mckee, D. D.; Moore, J. T.; Willson, T. M. **2001**, *98* (24), 13919–13924.
- (114) Mol inspiration properties <http://www.molinspiration.com/services/psa.html>.
- (115) Krasavin, M.; Lukin, A.; Bagnyukova, D.; Zhurilo, N.; Golovanov, A. *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, *24* (21), 5481–5494.
- (116) Huang, J.; Guo, B.; Chu, W. J.; Xie, X.; Yang, Y. S.; Zhou, X. L. *Chinese Chem. Lett.* **2016**, *27* (1), 159–162.

- (117) No Title <http://www.ehealthme.com/ds/lansoprazole/hyperglycemia/>.
- (118) Guasch, L.; Sala, E.; Valls, C.; Blay, M.; Mulero, M.; Arola, L.; Pujadas, G.; Garcia-Vallvé, S. J. *Comput. Aided. Mol. Des.* **2011**, *25* (8), 717–728.
- (119) Capelli, D.; Cerchia, C.; Montanari, R.; Loiodice, F.; Tortorella, P.; Laghezza, A.; Cervoni, L.; Pochetti, G.; Lavecchia, A. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (October), 1–12.
- (120) Zhao, H.; Liu, G.; Xin, Z.; Serby, M. D.; Pei, Z.; Szczepankiewicz, B. G.; Hajduk, P. J.; Abad-zapatero, C.; Hutchins, C. W.; Lubben, T. H.; Ballaron, S. J.; Haasch, D. L.; Kaszubska, W.; Rondinone, C. M.; Trevillyan, M.; Jirousek, M. R. **2004**, *14*, 5543–5546.
- (121) Srivastava, A.; Yano, J.; Hirozane, Y.; Kefala, G.; Gruswitz, F.; Snell, G.; Lane, W.; Ivetac, A.; Aertgeerts, K.; Nguyen, J.; Jennings, A.; Okada, K. *Nature* **2014**, *513* (7516), 124–127.

11. PARTE EXPERIMENTAL

10.1 Instrumentación

La síntesis de los compuestos finales **ACB-1-10** y los precursores **11-21** se llevó a cabo con reactivos de Sigma Aldrich®.

Se utilizaron matraces de bola de 25, 50 y 100 mL, provistos con agitador magnético de la marca Cienceware®, modelo Spinbar de tamaño 5/8" X 5/16" y parrilla de calentamiento de la marca Science MED MS-H-S.

La evaporación de los disolventes se realizó a presión reducida empleando un rotaevaporador de la marca BUCHI R-II, con bomba de vacío marca vacuubrand, modelo vacuum pump, vacío de 80mbar y equipo recirculador enfriador marca PolyScience®, R-134A.

Los puntos de fusión (pf) de los compuestos, se midieron en un aparato marca Santford Research System) EZ-Melt, modelo MPA 120.

Los espectros de masas en la modalidad IE (Impacto Electrónico) se determinaron en un espectrómetro de masas de alta resolución marca JOEL modelo Mstation 700 con un intervalo espectral de 1 a 500^o m/z.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) fueron obtenidos a 600 MHz, en espectrómetros de marca VARIAN modelo Mercury-200 MHz multinuclear y modelo Inova-400 MHz también de marca VARIAN. Se utilizó como estándar de referencia interno tetrametilsilano (TMS) y DMSO deuterado como disolvente. Los desplazamientos (δ) están expresados en partes por millón (ppm).

10.2 Cromatografía

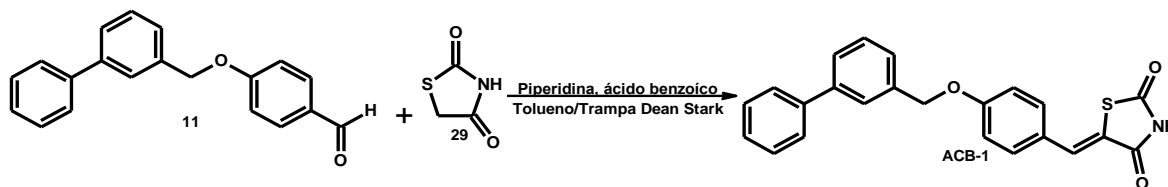
El avance de las reacciones químicas realizadas se monitoreo por cromatografía en capa fina (ccf) en placas de 2.5 cm x 4 cm recubiertas con sílice gel 60 (Merck- F254). La visualización se llevó a cabo con lámpara de luz ultravioleta a longitudes de onda de 254/366 nm (entela UVGL-25) y con vapores de yodo. Para la elución de las placas cromatográficas se utilizaron los siguientes sistemas.

Tabla 34. Fases móviles utilizadas para el monitoreo en CCF.

Sistema	Composición	Proporción
I	Hex Acoet	75:25
II	Hex:Acoet	90:10
III	Hex:Acoet	80:20
IV	Hex:Acoet	85:15
V	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	95:5
VI	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	98:2
VII	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	93:7

10.3 Síntesis de los compuestos finales ACB-1-10

10.3.1 Síntesis de (5Z)-5-[4-(bifenil-3-ilmetoxi)benciliden]-1,3-tiazolidin-2,4-diona (ACB-1)

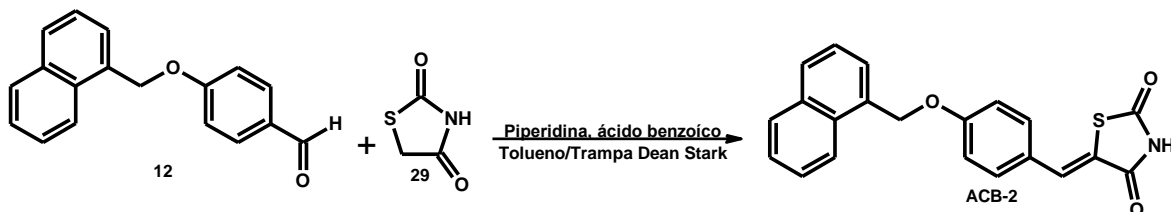


En un matraz bola de 25 mL equipado con agitación magnética y trampa Dean-Stark para remover el agua generada durante la reacción, se adicionaron 0.15 g (0.520 mmol) de 4-(bifenil-3-ilmetoxi)benzaldehído (**11**), 0.019 g ácido benzoico (0.156 mmol, 0.3 eq) y 0.061 g de 1,3-tiazolidin-2,4-diona (0.520 mmol, 1 eq.) en 1 mL de tolueno. Dicha mezcla se mantuvo en agitación a 40 °C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se colocaron 0.054 mL de piperidina (0.156 mmol, 0.3 eq) manteniendo en agitación durante 18 h. Consecutivamente se filtró la reacción resultando un sólido amarillo. El producto se purificó por lavados con etanol por duplicado, obteniendo un sólido amarillo claro (0.173 g) con un rendimiento de 86 %, un punto de fusión de 218.7-220 °C y una sola mancha en ccf (Sistema I)

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 5.29 (s, 2H, CH₂), 7.24 (d, 2H, J= 8.76, H-3A, H-5A), 7.41 (t, 1H, J= 7.38, H-4C), 7.54-7.48 (m, 4H, H-4B, H-6B, H-3C, H-5C), 7.67 (d, 1H, J= 7.56, H-5B) 7.70 (d, 2H, 7.5, H-2C, H-6C), 7.78 (s, 1H, H-2B), 7.79 (s, 1H, CH) 12.56 (s, 1H, NH) ppm. ¹³C-RMN (DMSO-d₆) δ: 70(CH₂), 116.2 (C-3A, C-5A), 120.9 (C-5), 126.2 (C-6B), 126.6 (C-2B), 126.8 (C-4B), 127.2 (C-3C, C-5C), 127.3 (C-4C), 128 (CH), 129.4 (C-2C, C-6C), 129.6 (C-5B), 132.5 (C-2A, C-6A), 137.7 (C-1C), 140.3 (C-1B), 140.8 (C-3B), 160.5 (C-4A), 167.9 (C-4), 168.4 (C2) ppm.

MS/EI: m/z (% int. rel). 152 (M -235), 355 (M-32) 5%, 167 (M-220) 100%.

10.3.2 Síntesis de (5Z)-5-[4-(1-naftilmetoxi)benciliden]-1,3-tiazolidin-2,4-diona (ACB-2)

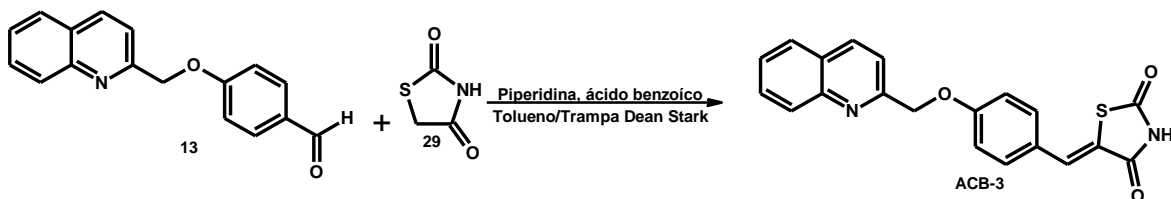


En un matraz bola de 25 mL equipado con agitación magnética y trampa Dean-Stark para remover el agua generada durante la reacción, se adicionaron 0.25 g (0.951 mmol) de 4-(1-naftilmetoxi)benzaldehído (**12**), 0.035 g ácido benzoico (0.285 mmol, 0.3 eq) y 0.111 g de 1,3-tiazolidin-2,4-diona (0.951 mmol, 1 eq.) en 1.25 mL de tolueno. Dicha mezcla se mantuvo en agitación a 40 °C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se colocaron 0.028 mL de piperidina (0.285 mmol, 0.3 eq) manteniendo en agitación durante 14 h. Consecutivamente se filtró la reacción resultando un sólido amarillo. El producto se purificó por lavados con etanol por duplicado, obteniendo un sólido amarillo claro (0.295 g) con un rendimiento de 84 %, un punto de fusión de 242.6-244.4 °C y una sola mancha en ccf (Sistema II)

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 5.66 (s, 2H, CH₂), 7.29 (d, 2H, 8.64, H-3A, H-5A), 7.54 (t, 1H, 8.04, H-3') 7.66-7.58 (m, 4H, H-2A, H-6A, H-2', H-6'), 7.71 (d, 1H, 6.96, H-7'), 7.79 (s, 1H, CH), 7.97 (d, 1H, 8.22, H-4'), 8.01 (d, 1H, 8.1, H-5'), 8.11 (d, 1H, 8.04, H-8') 12.55 (s, 1H, NH) ppm. ¹³C- RMN (DMSO-d₆) δ: 68.5 (CH₂), 116.2 (C-3A, C-5A), 120.9 (C-5), 124.2 (C-8'), 125.8 (C-3'), 126.2 (C-6'), 126.5 (C-7'), 127 (C-1A), 127.3 (CH), 129.3 (C-5'), 131.5 (C-4'), 132.4 (C-4a), 132.5 (C-2A, C-6A), 129 (C-2'), 133.7 (C-1'), 160.6 (C-4A), 168.4 (C-2), 167.9 (C-4) ppm.

MS/EI: m/z (% int. rel). 330 (M-31) 8%, 220 (M-141) 10%, 141 (M-220) 100%.

10.3.3 Síntesis de (5Z)-5-[4-(quinolin-2-ilmetoxi)benciliden]-1,3-tiazolidin-2,4-diona (ACB-3)

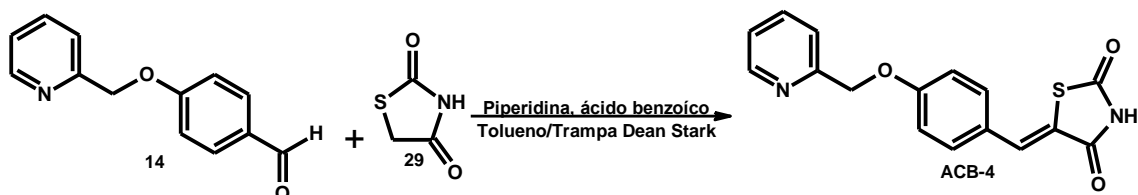


En un matraz bola de 25 mL equipado con agitación magnética y trampa Dean-Stark para remover el agua generada durante la reacción, se adicionaron 0.1 g (0.379 mmol) de 4-(quinolin-2-ilmetoxi)benzaldehído (**13**), 0.014 g ácido benzoico (0.113 mmol, 0.3 eq) y 0.044 g de 1,3-tiazolidin-2,4-diona (0.379 mmol, 1 eq.) en 0.5 mL de tolueno. Dicha mezcla se mantuvo en agitación a 40 °C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se colocaron 0.011 mL de piperidina (0.113 mmol, 0.3 eq) manteniendo en agitación durante 18 h. Consecutivamente se filtró la reacción resultando un sólido amarillo. El producto se purificó por lavados con etanol por duplicado, obteniendo un sólido amarillo claro (0.105 g) con un rendimiento de 77 %, un punto de descomposición de 223°C y una sola mancha en ccf (Sistema III)

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 5.43 (s, 2H, CH₂)7.24 (d, 2H, 8.88, H-3A, H-5A)7.57 (d, 2H, 8.8, H-2A, H-6A), 7.63 (dd, 1H, H-6')7.68 (d, 1H, 8.43, H-4') , 7.75 (s, 1H, CH), 7.8 [dd, 1H, 8.4 (7'-8'), 6.96 (7'-6'), 1.44 (7'-5')], 8.0 (d, 1H, 8.28, H-5'), 8.03 (d, 1H, 8.52, H-8'), 8.43 (d, 1H, 8.46, H-4')12.53 (s, 1H, NH) ppm. RMN ¹³C (DMSO-d₆) δ: 71.4 (CH₂), 116.2 (C-3A, C-5A), 120 (C-5), 121.1 (C-3'), 126.4 (C-6'), 127.1 (C-1A),127.6 (CH), 128.6 (C-5'), 129 (C-4a), 130.4 (C-8'), 132.6 (C-2A,A-6A), 132.1 (C-7'), 137.6 (C-4'), 147.4 (C-8a)157.4 (C-2'), 160.3 (C-4A), 168 (C-4), 168.4 (C-2) ppm.

MS/EI: m/z (% int. rel). 150 (M-212) 40%.

10.3.4 Síntesis de (5Z)-5-[4-(piridin-2-ilmetoxi)enciliden]-1,3-tiazolidin-2,4-diona (ACB-4)

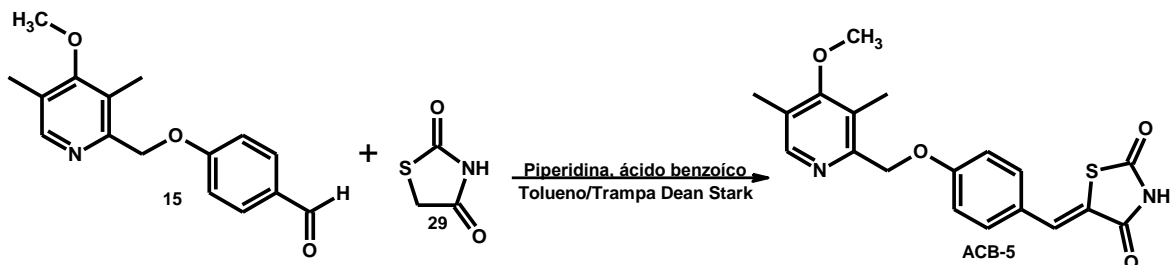


En un matraz bola de 25 mL equipado con agitación magnética y trampa Dean-Stark para remover el agua generada durante la reacción, se adicionaron 0.15 g (0.704 mmol) de 4-(piridin-2-ilmetoxi)benzaldehído (**14**), 0.026 g ácido benzoico (0.211 mmol, 0.3 eq) y 0.082 g de 1,3-tiazolidin-2,4-diona (0.704 mmol, 1 eq.) en 1 mL de tolueno. Dicha mezcla se mantuvo en agitación a 40 °C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se colocaron 0.020 mL de piperidina (0.211 mmol, 0.3 eq) manteniendo en agitación durante 20 h. Consecutivamente se filtró la reacción resultando un sólido amarillo claro. El producto se purificó por lavados con metanol por duplicado, obteniendo un sólido beige (0.146 g) con un rendimiento de 69 %, un punto de descomposición de 219.9 °C y una sola mancha en ccf (Sistema IV)

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 5.26 (s, 2H, CH₂), 7.19 (d, 2H, H-2A, H-6A, J= 8.58), 7.36 (t, 1H, H-5B, J= 5.36, J= 6.9), 7.53 (d, 1H, H-3B, 7.8), 7.56 (d, 2H, H-3A, H-5A, J= 8.58), 7.75 (s, 1H, CH), 7.85 (t, 1H, H-4B, J= 7.62), 8.60 (d, 2H, H-6B, J= 4.44), 12.53 (s, 1H, NH) ppm. ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ: 70.9 (CH₂), 116.1 (C-2A, C-6A), 121.0 (C-5), 122.2 (C-5B), 123.5 (C-3B), 126.3 (C-4A), 132.1 (C-4B), 132.5 (C-3A, C-5A), 137.5 (CH), 149.6 (C-6B), 156.5 (C-2B), 160.2 (C-1A), 167.9 (C-4), 168.4 (C-2) ppm.

MS/EI: m/z (% int. rel). 204 (M -108) 100%.

10.3.5 Síntesis de 5Z)-5-{4-[(4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metoxi]benciiden}-1,3-tiazolidin-2,4-diona (ACB-5)

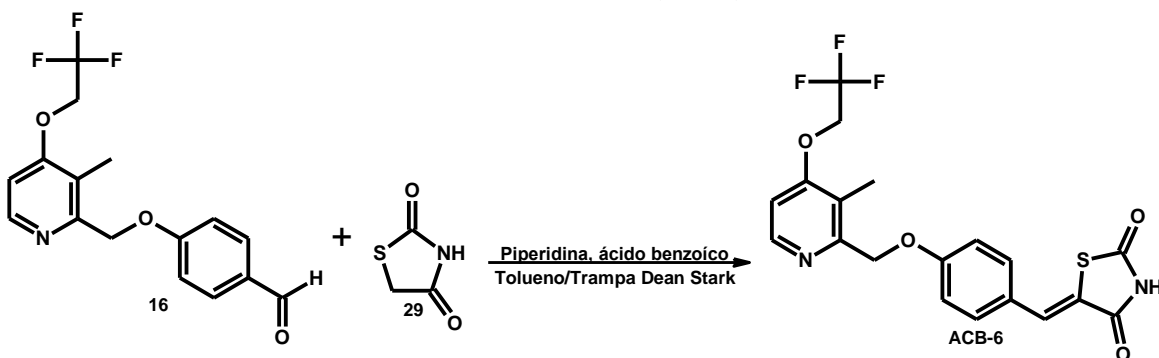


En un matraz bola de 25 mL equipado con agitación magnética y trampa Dean-Stark para remover el agua generada durante la reacción, se adicionaron 0.2 g (0.737 mmol) de 4-[(4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metoxi]benzaldehído (**15**), 0.036 g ácido benzoico (0.221 mmol, 0.3 eq) y 0.095 g de 1,3-tiazolidin-2,4-diona (0.737 mmol, 1 eq.) en 1 mL de tolueno. Dicha mezcla se mantuvo en agitación a 40 °C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se colocaron 0.029 mL de piperidina (0.221 mmol, 0.3 eq) manteniendo en agitación durante 8 h. Consecutivamente se filtró la reacción resultando un sólido amarillo. El producto se purificó por lavados con etanol por duplicado, obteniendo un sólido amarillo claro (0.237 g) con un rendimiento de 90 %, un punto de fusión de 235.6-238.2°C y una sola mancha en ccf (Sistema I)

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 2.22 (s, 3H, CH₃), 2.25 (s, 3H, CH₃'), 3.74 (s, 3H, O-CH₃) 5.22 (s, 2H, CH²), 7.20 (d, 2H, 8.82, H-3A, H-5A) 7.55 (d, 2H, 8.76, H-2A, H-6A) 7.75 (s, 1H, CH), 8.23 (s, 1H, H-6B) 12.52, s, 1H (NH) ppm. RMN ¹³C (DMSO-d₆) δ: 10.9 (CH₃), 13.4 (CH₃') 60.2 (O-CH₃), 70.9 (CH₂), 116.1 (C-3A, C-5A), 120.9 (C-2B), 126.2 (C-5B), 126.4 (C-5), 126.6 (C-1A), 132.2 (CH), 132.5 (C-2A, C-6A), 149.8 (C-6B), 154 (C-4A), 160.6 (C-2B), 164.1 (C-4B), 167.9 (C-4), 168.4 (C-2) ppm.

MS/EI: m/z (% int. rel). 367 (M-3), 204 (M-166) 100%.

10.3.6 Síntesis de (5Z)-5-(4-([3-metil-4-(2,2,2-trifluoroetoxi)piridin-2-il]metoxi)benciliden)-1,3-tiazolidin-2,4-diona (ACB-6)

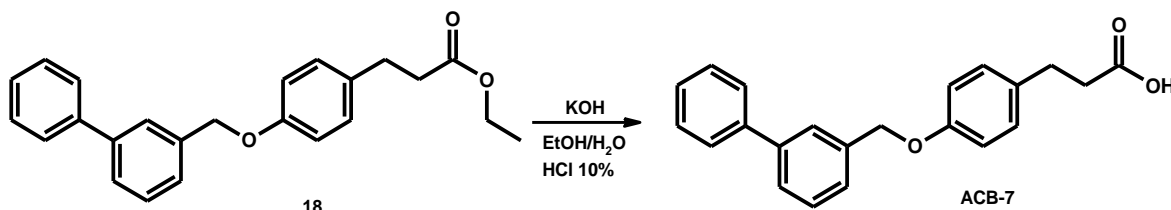


En un matraz bola de 25 mL equipado con agitación magnética y trampa Dean-Stark para remover el agua generada durante la reacción, se adicionaron 0.2 g (0.951 mmol) de 4-([3-metil-4-(2,2,2-trifluoroetoxi)piridin-2-il]methoxi)benzaldehído (**16**), 0.035 g ácido benzoico (0.285 mmol, 0.3 eq) y 0.111 g de 1,3-tiazolidin-2,4-diona (0.951 mmol, 1 eq.) en 1.25 mL de tolueno. Dicha mezcla se mantuvo en agitación a 40 °C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se colocaron 0.028 mL de piperidina (0.285 mmol, 0.3 eq) manteniendo en agitación durante 18 h. Consecutivamente se filtró la reacción resultando un sólido amarillo. El producto se purificó por lavados con etanol por duplicado, obteniendo un sólido amarillo claro (0.295 g) con un rendimiento de 86 %, un punto de fusión de 218.7-220 °C y una sola mancha en ccf (Sistema III)

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 2.21 (s, 3H, CH₃), 4.92 (c, 2H, O-CH₂-CF₃), 5.28 (s, 2H, CH₂), 7.16 (d, 1H, 5.76, H-5B), 7.19 (d, 1H, 8.76, H-3A, H-5A), 7.55 (d, 1H, 8.7, H-2A, H-6A), 7.75 (s, 1H, CH), 8.36 (d, 1H, 5.64, H-6B), 12.52 (s, 1H, NH) ppm. RMN ¹³C (DMSO-d₆) δ: 10.4 (CH₃), 65.4-64.7 (O-CH₂-CF₃), 70.7 (CH₂), 108.2 (C-5B), 116.1 (C-3A, C-5A), 120.9 (C-3B), 121.8 (C-5), 126.2 (CF₃), 126.9 (C-1A), 132.2 (CH), 132.5 (C-2A, C-6A), 148.2 (C-6B), 155.2 (C-4A), 160.5 (C-2B), 161.8 (C-4B), 167.9 (C-4), 168.4 (C-2) ppm.

MS/EI: m/z (% int. rel). 384 (M-25) 100%.

10.3.7 Síntesis de ácido 3-[4-(bifenil-3-ilmetoxi)fenil]propanoico (ACB-7)

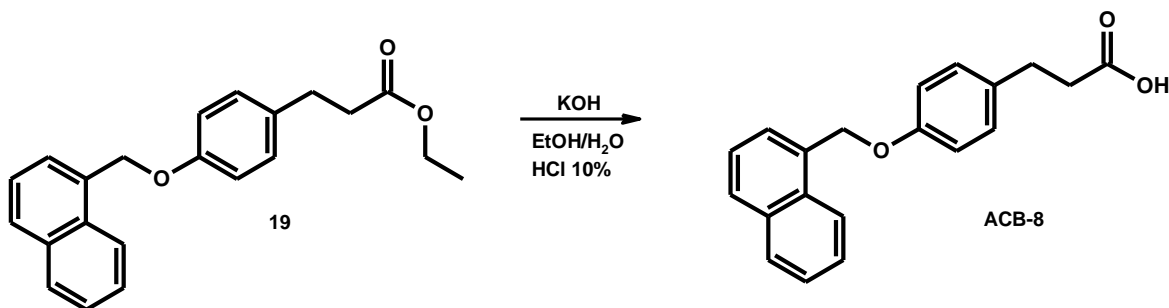


En un matraz bola de 25 mL equipado con agitación magnética y refrigerante en posición de reflujo, en baño de agua (60 °C), se colocaron 0.6 g (1.66 mmol) del precursor **18** en 3 mL de etanol (EtOH). Esta mezcla se mantuvo en agitación hasta su completa disolución, posteriormente se adicionaron lentamente 0.186 g de KOH (3.31 mmol, 2eq) previamente disueltos en 3 mL de agua. Dicha mezcla se dejó reaccionar durante 5 horas a temperatura de reflujo. Al término de este tiempo, se rotaevaporó el EtOH y se acidificó el medio con HCl 10% hasta obtener un pH de 3, consecutivamente se filtró al vacío obteniendo un sólido blanco. Seguido de esto, se llevó a cabo una recristalización con etanol X2 obteniendo hojuelas blancas nacaradas (0.46 g) con un rendimiento de 83 %, un punto de fusión de 123.7-126 °C y una sola mancha en ccf (Sistema V).

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 2.43 (t, 2H, CH₂), 2.74 (t, 2H, CH₂), 5.13 (s, 2H, CH₂), 6.94 (d, 2H, H-3A, H-5A, J = 7.74 Hz), 7.14 (d, 2H, H-2A, H-6A, J = 8.04 Hz), 7.4 (t, 1H, H-4C), 7.43 (d, 1H, H-4B, J = 7.2 Hz), 7.48–7.46 (m, 3H, H-6B, H-3C, H-5C), 7.61 (t, 1H, H-5B, J = 7.5 6Hz), 7.66 (d, 2H, H-2C, H-6C, J = 8.22 Hz), 7.72 (s, 1H, H-2C) ppm. ¹³C- RMN (DMSO-d₆) δ: 30.4 (CH₂), 36.9 (CH₂), 69.6 (O-CH₂), 115.1 (C-3A, C-5A), 126.4 (C-6B), 126.6 (C-4B), 127.1 (C-2C, C-6C), 128 (C-4C), 129.4 (C-3C, C-5C), 129.5 (C-5B), 129.7 (C-2A, C-6A), 134 (C-1A), 138.5 (C-1C), 140.4 (C-1B), 140.8 (C-3B), 157.0 (C-4A), 174.7 (C=O) ppm.

MS/EI: m/z (% int. rel). 353 (M + Na), 178 (M + Na-175) 100%.

10.3.8 Síntesis de ácido 3-[4-(1-naftilmetoxi)fenil]propanoico (ACB-8)

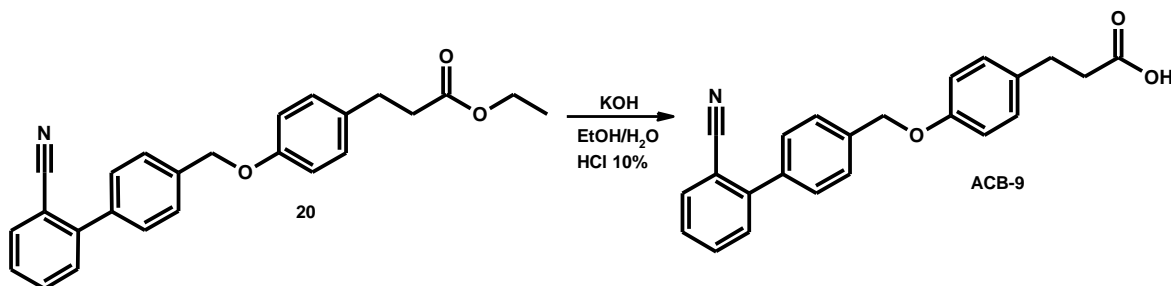


En un matraz bola de 25 mL equipado con agitación magnética y refrigerante en posición de reflujo, en baño de agua (60°C), se colocaron 0.41 g (1.22 mmol) del precursor **19** en 2 mL de etanol (EtOH). Esta mezcla se mantuvo en agitación hasta su completa disolución, posteriormente se adicionaron lentamente 0.138 g de KOH (2.46 mmol, 2eq) previamente disueltos en 2 mL de agua. Dicha mezcla se dejó reaccionar durante 5 horas a temperatura de reflujo. Al término de este tiempo, se rotaevaporó el EtOH y se acidificó el medio con HCl 10% hasta obtener un pH de 3, consecutivamente se filtró al vacío obteniendo un sólido beige. Seguido de esto, se llevó a cabo una recristalización metanol: hexano 95:5 obteniendo un sólido blanco (0.19 g) con un rendimiento de 51 %, un punto de fusión de 124.8-127.8 °C y una sola mancha en ccf (Sistema VI).

¹H-RMN (DMSO-d₆) δ: 2.49 (t, 2H, CH₂), 2.76 (t, 2H, CH₂), 5.50 (s, 2H, CH₂), 7.0 (d, 2H, H-3A, H-5A, J = 8.46 Hz), 7.16 (d, 2H, H-2A, H-6A, J = 8.46 Hz), 7.51 (t, 1H, H-3', J = 7.56 Hz), 7.58–7.55 (m, 2H, H-6', H-7'), 7.66 (d, 1H, J = 6.9 Hz), 7.92 (d, 1H, J = 8.52 Hz), 7.97 (d, 1H, J = 7.86 Hz), 8.08 (d, 1H, J = 7.97 Hz).: ¹³C-RMN (DMSO-d₆) δ: 30.0 (CH₂), 36.1 (CH₂), 68.2 (CH₂), 115.1 (C-3A, C-5A), 124.3 (C-8'), 125.8 (C-3'), 126.4 (C-6'), 126.9 (C-7'), 127.03 (C-2'), 128.9 (C-5'), 129.0 (C-4'), 129.7 (C-2A, C-6A), 131.6 (C-8a), 133.1 (C-1A), 133.6 (C-4a), 133.7 (C-10), 157.2 (C-4A), 174.3 (C=O) ppm.

MS/EI: m/z (% int. rel.). 306 (M+), 141(M-165)100%.

10.3.8 Síntesis de ácido 3-{4-[(2'-cianobifenil-4-il)metoxi]fenil}propanoico (ACB-9)

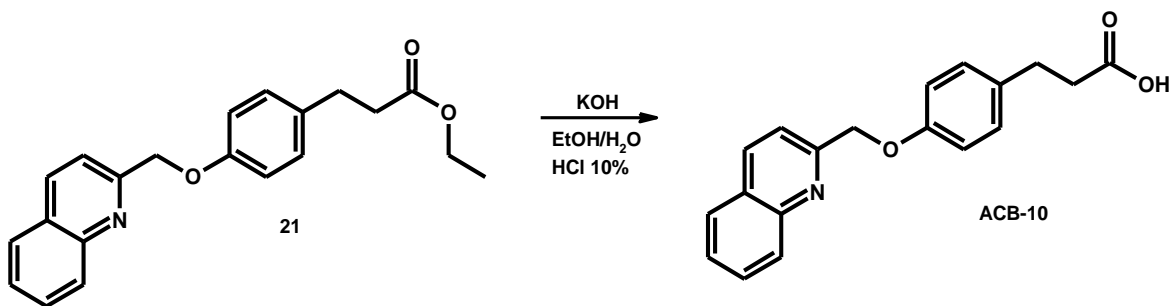


En un matraz bola de 25 mL equipado con agitación magnética y refrigerante en posición de reflujo, en baño de agua (60°C), se colocaron 0.5 g (1.30 mmol) del precursor **20** en 2.5 mL de etanol (EtOH). Esta mezcla se mantuvo en agitación hasta su completa disolución, posteriormente se adicionaron lentamente 0.15 g de KOH (2.67 mmol, 2eq) previamente disueltos en 2.5 mL de agua. Dicha mezcla se dejó reaccionar durante 3 horas a temperatura de reflujo. Al término de este tiempo, se rotaevaporó el EtOH y se acidificó el medio con HCl 10% hasta obtener un pH de 3, consecutivamente se vertió en agua fría y se extrajo con AcOEt (3 x 15 mL) y se rotaevaporó a presión reducida, de lo cual se obtuvo un líquido incoloro. Posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente dando como resultado un sólido blanco y se llevó a cabo una recristalización con etanol (x2) obteniendo hojuelas blancas nacaradas (0.39 g) con un rendimiento de 85 %, un punto de fusión de 174-176.9 °C y una sola mancha en ccf (Sistema VII).

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 2.66 (t, 2H, CH₂), 2.91 (t, 2H, CH₂), 5.11 (s, 2H, CH₂), 6.93 (d, 2H, H-3A, H-5A, J = 8.52 Hz), 7.15 (d, 2H, H-2A, H-6A, J = 8.46 Hz), 7.44 (t, 1H, H-4C, J = 7.68 Hz), 7.51 (d, 1H, H-6C, J = 7.86 Hz), 7.55 (2H, H-3B, H-5B, J = 8.22 Hz), 7.58 (2H, H-2B, H-6B, J = 8.16 Hz), 7.63 (t, 1H, H-5C, J = 7.62 Hz), 7.76 (d, 1H, H-3C, J = 7.74 Hz), 12.10 (s, 1H, OH) ppm. ¹³C-RMN (CDCl₃) δ : 29.8 (CH₂), 35.9 (CH₂), 69.6 (CH₂), 111.3 (C-2C), 118.6 (CN), 114.9 (C-3A, C-5A), 127.6 (C-4C), 127.7 (C-3B, C-5B), 129 (C-2B, C-6B), 129.3 (C-2A, C-6A), 130.0 (C-6C), 132.8 (C-5C), 133.8 (C-3C), 137.7 (C-4B), 137.8 (C-1B), 145.1 (C-1C), 157.2 (C-4A), 178.7 (C=O) ppm.

MS/EI: m/z (% int. rel). 355 (M⁺), 192 (M-165) 100%.

10.3.10 Síntesis de ácido 3-[4-(quinolin-2-ilmetoxi)fenil]propanoico (ACB-10)

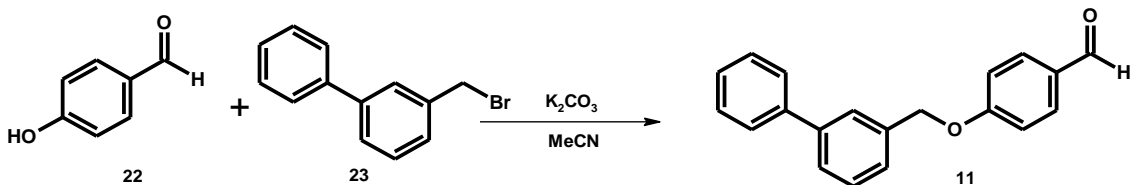


En un matraz bola de 25 mL equipado con agitación magnética y refrigerante en posición de reflujo, en baño de agua (60°C), se colocaron 0.86 g (2.56 mmol) del precursor **22** en 4.5 mL de etanol (EtOH). Esta mezcla se mantuvo en agitación hasta su completa disolución, posteriormente se adicionaron lentamente 0.29 g de KOH (5.17 mmol, 2eq) previamente disueltos en 4.5 mL de agua. Dicha mezcla se dejó reaccionar durante 3 horas a temperatura de reflujo. Al término de este tiempo, se rotaevaporó el EtOH y se acidificó el medio con HCl 10% hasta obtener un pH de 3, consecutivamente se filtró al vacío obteniendo un sólido beige. Seguido de esto, se llevó a cabo una recrystalización con metanol (x2) obteniendo cristales beige (0.71 g) con un rendimiento de 95 %, un punto de fusión de 125.8-128.4 °C y una sola mancha en ccf (Sistema VII).

¹H-RMN (DMSO-d₆) δ: 2.49 (t, 2H, CH₂), 2.74 (t, 2H, CH₂), 5.33 (s, 2H, CH₂), 6.97 (d, 2H, H-3A, H-5A, J = 8.82 Hz), 7.15 (d, 2H, H-2A, H-6a, J = 8.34 Hz), 7.62 (t, 1H, H-6', J = 7.8, J = 7.14 Hz), 7.66 (d, 1H, H-3', J = 8.4 Hz), 7.79 (t, 1H, H-7', J = 6.96, J = 8.34 Hz), 7.99, d, 1H, H-5', J = 8.16 Hz), 8.02 (d, 1H, H-4', J = 8.46 Hz), 8.41, d, 1H, H-8', J = 8.52 Hz), 12.1 (s, 1H, OH) ppm. ¹³C-RMN (DMSO-d₆) δ: 29.9 (CH₂), 35.9 (CH₂), 71.2 (CH₂), 115.1 (C-3A, C-5A), 119.9 (C-3'), 127.01 (C-6'), 128.4 (C-4a), 129.0 (C-7'), 129.8 (C-2A, C-6A), 130.3 (C-50), 133.8 (C-1A), 137.5 (C-4'), 147.4 (C-8a), 156.9 (C-4A), 158.2 (C-2'), 174.2 (C=O) ppm. MS/EI: m/z (% int. rel). 307 (M+) 100%, 142 (M-165) 75%.

10.4 Síntesis de precursores 11-21

10.4.1 Síntesis de 4-(bifenil-3-ilmetoxi)benzaldehído (11)

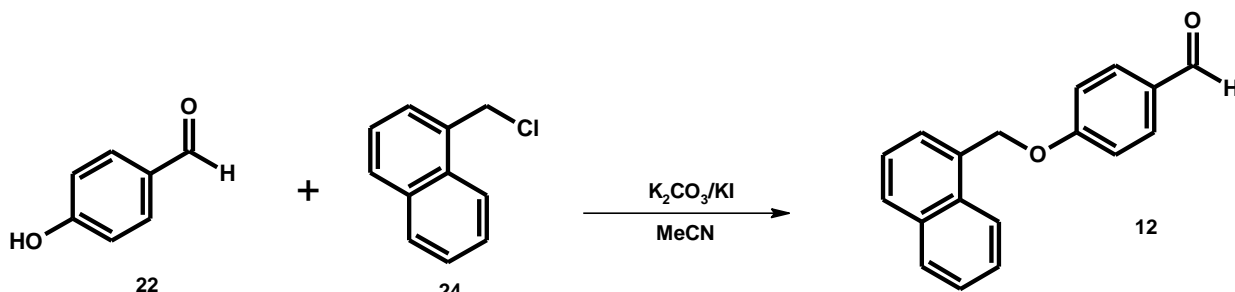


En un matraz redondo de 25 mL equipado con agitación magnética, baño de aceite y refrigerante en posición de reflujo, se adicionaron 0.3 g de 4-hidroxibenzaldehído (**22**) (2.45 mmol) y 0.68 g de carbonato de potasio (4.91 mmol, 2eq) en 3 mL de MeCN. Esta mezcla se calentó a 40 °C durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se añadieron lentamente 0.61 g de 3-(bromometil)bifenilo (2.46 mmol, 1.1 eq) previamente disuelto en 3 mL de MeCN dejando reaccionar a reflujo durante 11 horas. Seguido de esto se filtró con vacío el crudo de la reacción para remover las sales derivadas de carbonato de potasio. La solución obtenida se concentró al alto vacío a 60°C obteniendo un líquido incoloro. Consecutivamente se adicionó agua fría y se extrajo con AcOEt (3 x 15 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se rotaevaporó a presión reducida dando como resultado un sólido blanco. Posteriormente se recristalizó en Hexano:Etanol 50:50 logrando cristales blancos (0.23 g) con un rendimiento de 32 %, punto de fusión 63-64.1°C y con una sola mancha por ccf (Sistema I).

1H -RMN (DMSO- d_6) δ : 5.31 (s, 2H, CH_2), 7.25 (d, 2H, 8.28, H-3A, H-5A), 7.39 (t, 1H, 6.84, H-4C), 7.52-7.48 (m, 4H, H-4B, H-6B, H-3C, H-5C), 7.68-7.64 (m, 3H, H-5B, H-2C, H-6C), 7.77 (s, 1H, H-2B), 7.89 (d, 2H, 8.52, H-2A, H-6A), 9.88 (s, 1H, CHO) ppm. ^{13}C -RMN (DMSO- d_6) δ : 115.7 (C-3A, C-5A), 126.7 (C-4B), 126.9 (C-2B), 127.2 (C-3C, C-5C), 127.3 (C-5B), 128 (C-4C), 129.4 (C-2C, C-6C), 129.6 (C-6B), 130.2 (C-1A), 132.2 (C-2A, C-6A), 137.5 (C-1B), 140.3 (C-1C) 140.9 (C-3B), 163.7 (C-4A), 191.7 (CHO) ppm.

MS/EI: m/z (% int. rel). 287 (M-1), 167 (M-121)100%.

10.4.2 Síntesis de 4-(1-naftilmetoxi)benzaldehído (12)

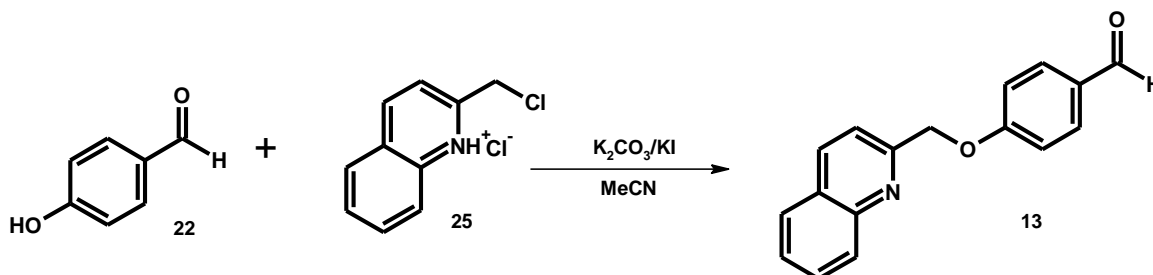


En un matraz redondo de 25 mL equipado con agitación magnética, baño de aceite y refrigerante en posición de reflujo, se adicionaron 0.3 g de 4-hidroxibenzaldehído (**22**) (2.45 mmol) y 0.68 g de carbonato de potasio (4.91 mmol, 2eq) en 3 mL de MeCN. Esta mezcla se calentó a 40 °C durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se añadieron lentamente 0.37 mL de 1-(clorometil)naftaleno (2.70 mmol, 1.1 eq) previamente disuelto en 3 mL de MeCN y KI (10%) dejando reaccionar a reflujo durante 5 horas. Seguido de esto se rotaevaporó el crudo de la reacción a 60°C y se agregaron 4 mL de agua fría para remover las sales derivadas de carbonato de potasio. La solución obtenida se filtró al vacío obteniendo un sólido beige. Consecutivamente se recrystalizó en etanol logrando cristales blancos (0.55 g) con un rendimiento de 85 %, punto de fusión 104.2-106.3 °C y con una sola mancha por ccf (Sistema IV).

1H -RMN (DMSO- d_6) δ : 5.7 (s, 2H, CH_2), 7.31 (d, 2H, 8.52, H-3A, H-5A), 7.53 (t, 1H, 7.32, 7.86, H-3'), 7.59 (dd, 2H, H-6', H-7'), 7.71 (d, 1H, H-2', 6.9), 7.90 (d, 2H, 8.34, H-2A, H-6A), 7.96 (d, 1H, 8.28, H-4'), 7.99 (d, 1H, 7.74, H-5'), 8.10 (d, 1H, 7.98, H-8') ppm. ^{13}C -RMN (DMSO- d_6) δ : 68.7 (CH_2), 115.8 (C-3A, C-5A), 124.3 (C-8'), 125.8 (C-3'), 127 (C-7'), 126.5 (C-6'), 127.3 (C-2'), 129.4 (C-4'), 130.3 (C-8a), 131.5 (C-4A), 132.2 (C-2A, C-6A), 133.7 (C-1'), 163.8 (C-4a), 191.8 (CHO), ppm.

MS/EI: m/z (% int. rel). 262 (M+), 141 (M-121) 100%.

10.4.3 Síntesis de 4-(quinolin-2-ilmetoxi)benzaldehído (13)

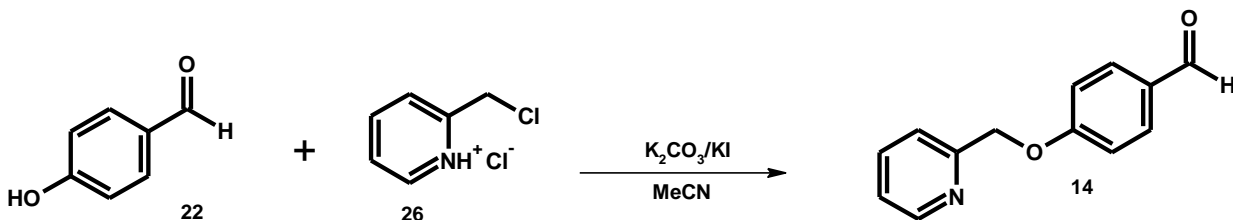


En un matraz redondo de 25 mL equipado con agitación magnética, baño de aceite y refrigerante en posición de reflujo, se adicionaron 0.2 g de 4-hidroxibenzaldehído (**22**) (1.63 mmol) y 0.68 g de carbonato de potasio (4.91 mmol, 3 eq) en 2 mL de MeCN. Esta mezcla se calentó a 40 °C durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se añadieron lentamente 0.38 g de clorhidrato de 2-(clorometil)quinolinio (1.77 mmol, 1.1 eq) previamente disuelto en 2 mL de MeCN y KI (10%) dejando reaccionar a reflujo durante 6.5 horas. Seguido de esto se filtró con vacío el crudo de la reacción para remover las sales derivadas de carbonato de potasio. La solución obtenida se concentró al alto vacío a 60°C y se agregaron 10 mL de agua fría y se llevó a cabo una extracción con AcOEt (3 x 15 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, obteniendo cristales amarillos, los cuales se formaron por evaporación lenta del disolvente. Consecutivamente se recristalizó en etanol (x2) logrando cristales amarillo claro (0.26 g) con un rendimiento de 60 %, punto de fusión 82-84.2 °C y con una sola mancha por ccf (Sistema V).

1H -RMN (DMSO- d_6) δ : 5.51 (s, 2H, CH_2), 7.28 (d, 2H, 8.46, H-6'), 7.63 (dd, 1H, 6.93, 7.02, H-3'), 7.69 (d, 1H, 8.46, H-6'), 7.80 (dd, 1H, 6.96, 7.02, H-7'), 7.89 (d, 2H, 8.58, H-2A, H-6A), 8.01 (d, 1H, 8.16, H-5'), 8.03 (d, 1H, 8.52, H-8'), 8.44 (d, 1H, 8.46, H-4') 9.87 (CHO) ppm. ^{13}C -RMN (DMSO- d_6) δ : 71.6 (CH_2), 115.8 (C-3A, C-5A), 120 (C-3'), 127.2 (C-6'), 127.7 (C-4a), 128.4 (C-5'), 129 (C-8'), 130.4 (C-1A), 132.3 (C-2A, C-6A), 137.6 (C-4'), 147.4 (C-8a), 157.2 (C-2'), 163.5 (C-4A), 191.8 (CHO) ppm.

MS/EI: m/z (% int. rel). 263 (M+) 60%, 142 (M-121) 100%.

10.4.4 Síntesis de 4-(piridin-2-ilmetoxi)benzaldehído (14)

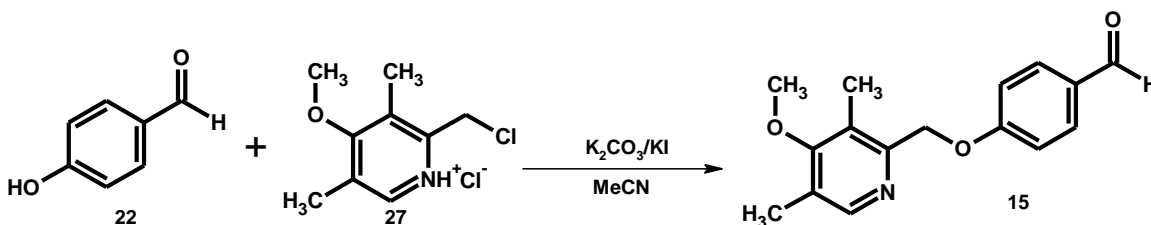


En un matraz redondo de 25 mL equipado con agitación magnética, baño de aceite y refrigerante en posición de reflujo, se adicionaron 0.3 g de 4-hidroxibenzaldehído (**22**) (2.45 mmol) y 1.02 g de carbonato de potasio (7.38 mmol, 3 eq) en 3 mL de MeCN. Esta mezcla se calentó a 40 °C durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se añadieron lentamente 0.51 g de clorhidrato de 2-(clorometil)piridinio (3.11 mmol) previamente disuelto en 3 mL de MeCN y KI (10%) dejando reaccionar a reflujo durante 10 horas. Seguido de esto se filtró con vacío el crudo de la reacción para remover las sales derivadas de carbonato de potasio. La solución obtenida se concentró al alto vacío a 60°C, se agregaron 10 mL de agua fría y se llevó a cabo una extracción con AcOEt (3 x 15 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, obteniendo un sólido beige. Consecutivamente se recristalizó en acetato de etilo (x2) logrando cristales beige algodonosos (0.33 g) con un rendimiento de 64 %, punto de fusión 88.9-91.1 °C y con una sola mancha por ccf (Sistema II).

1H -RMN (DMSO- d_6) δ : 5.31 (s, 2H, CH_2), 7.23 (d, 2H, 8.82, H-3A, H-5A), 7.37 (dd, 1H, 5.64, H-5B), 7.54 (d, 1H, 7.8, H-3B), 7.8 (dd, 1H, 7.74, H-4B), 7.88 (d, 2H, 8.82, H-2A, H-6A), 8.60 (d, 1H, 7.26, H-6B), 9.88 (CHO) ppm. ^{13}C -RMN (DMSO- d_6) δ : 71 (CH_2), 115.7 (C-3A, C-5A), 122.3 (C-5B), 123.6 (C-3B), 130.4 (C-1A), 132.3 (C-2A, C-6A), 137.5 (C-4B), 149.7 (C-6B), 156.3 (C-2B), 163.5 (C-4A), 191.7 (CHO) ppm.

MS/EI: m/z (% int. rel). 212 (M-1) 100%, 92 (M-121) 73%.

10.4.5 Síntesis de 4-[(4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metoxi]benzaldehído (15)



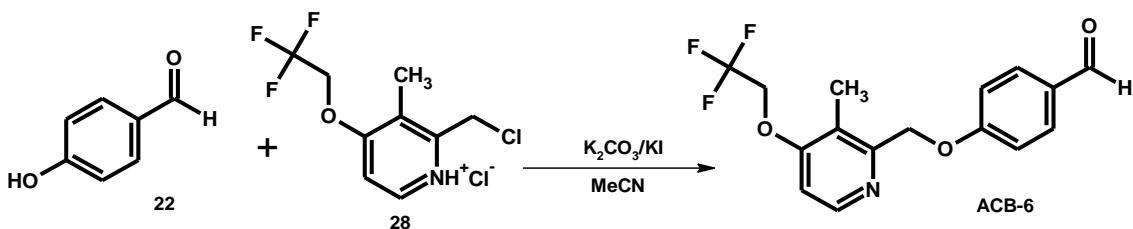
En un matraz redondo de 25 mL equipado con agitación magnética, baño de aceite y refrigerante en posición de reflujo, se adicionaron 0.3 g de 4-hidroxibenzaldehído (**22**) (2.45 mmol) y 1.18 g de carbonato de potasio (8.53 mmol, 3 eq) en 3 mL de MeCN. Esta mezcla se calentó a 40 °C durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se añadieron lentamente 0.64 g de clorhidrato de 2-(clorometil)-4-metoxi-3,5-dimetilpiridinio (2.89 mmol) previamente disuelto en 3 mL de MeCN y KI (10%) dejando reaccionar a reflujo durante 12 horas. Seguido de esto se filtró con vacío el crudo de la reacción para remover las sales derivadas de carbonato de potasio. La solución obtenida se concentró al alto vacío a 60°C y se agregaron 10 mL de agua fría y se llevó a cabo una extracción con AcOEt (3 x 15 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, obteniendo un sólido beige. Consecutivamente se recristalizó en Hexano:AcOEt 75:25 logrando cristales beige algodonosos (0.46 g) con un rendimiento de 69 %, punto de fusión 91.8-92.6 °C y con una sola mancha por ccf (Sistema VI).

¹H-RMN (DMSO-d₆) δ: 2.22 (s, 3H, CH₃), 2.26 (s, 3H, CH₃'), 3.74 (s, 3H, O-CH₃), 5.58 (s, 2H, CH₂), 7.23 (d, 2H, 8.58, H-3A, H-5A), 7.87 (d, 2H, 8.52, H-2A, H-6A), 8.23 (s, 1H, H-6B), 9.87 (s, 1H, CHO) ppm

¹³C-RMN (DMSO-d₆) δ: 10.9 (CH₃), 13.4 (CH₃'), 60.2 (O-CH₃), 71 (CH₂), 115.7 (C-3A, C-5A), 126.6 (C-3B), 126.7 (C-5B), 130.2 (C-1A), 132.2 (C-2A, C-6A), 149.14 (C-6B), 153.8 (C-2B), 163.8 (C-4B), 164.1 (C-4A), 191.7 (CHO) ppm.

MS/EI: m/z (% int. rel). 271 (M⁺) 100%, 120 (M-151), 152 (M-121) 44%.

10.4.6 Síntesis de 4-[[3-metil-4-(2,2,2-trifluoroetoxi)piridin-2-il]methoxi]benzaldehído (16)

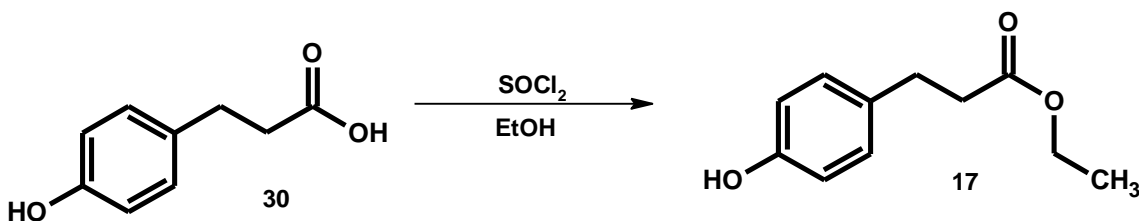


En un matraz redondo de 25 mL equipado con agitación magnética, baño de aceite y refrigerante en posición de reflujo, se adicionaron 0.2 g de 4-hidroxibenzaldehído (**22**) (1.63 mmol) y 0.68 g de carbonato de potasio (4.91 mmol, 3 eq) en 2 mL de MeCN. Esta mezcla se calentó a 40 °C durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se añadieron lentamente 0.52 g de clorhidrato de 2-(clorometil)-3-metil-4-(2,2,2-trifluoroetoxi)piridinio (1.89 mmol) previamente disuelto en 2 mL de MeCN y KI (10%) dejando reaccionar a reflujo durante 17 horas. Seguido de esto se filtró con vacío el crudo de la reacción para remover las sales derivadas de carbonato de potasio. La solución obtenida se concentró al alto vacío a 60°C y se agregaron 10 mL de agua fría y se llevó a cabo una extracción con AcOEt (3 x 15 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, obteniendo un sólido ámbar. Consecutivamente se recristalizó en metanol (x2) logrando cristales ámbar (0.37 g) con un rendimiento de 70 %, punto de fusión 118.6-120.5°C y con una sola mancha por ccf (Sistema III).

1H -RMN (DMSO- d_6) δ : 2.22 (s, 3H, CH_3), 4.92 (c, 2H, O- CH_2 - CF_3), 5.33 (s, 2H, CH_2), 7.17 (d, 1H, 6.3, H-5B), 7.23 (d, 2H, 8.52, H-3A, H-5A), 7.87 (d, 2H, 8.46, H-2A, H-6A), 8.37 (d, 1H, 5.64, H-6B), 9.87 (CHO) ppm. ^{13}C -RMN (DMSO- d_6) δ : 10.3 (CH_3), 65.1 (O- CH_2 - CF_3), 70.8 (CH_2), 108.1 (C-5B), 115.7 (C-3A, C-5A), 121.8 (C-3B), 130.3 (C-1A), 132.2 (C-2A, C-6A), 148.2 (C-6B), 155 (C-2B), 161.8 (C-4B), 163.7 (C-4A), 191.7 (CHO) ppm.

MS/EI: m/z (% int. rel). 325 (M+) 93%, 206 (M-119)100%, 106 (M-219) 100%.

10.4.7 Síntesis de 3-(4-hidroxifenil)propanoato de etilo (17)

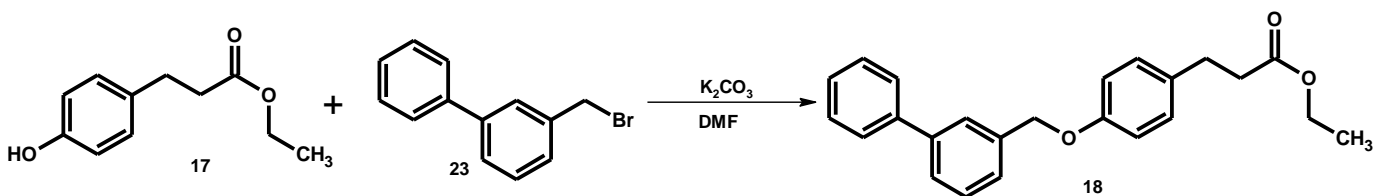


En un matraz redondo de 25 mL equipado con agitación magnética, baño de hielo y columna vigreux, se adicionó 2 g de ácido 3-(4-hidroxifenil)propanoico (12.03 mmol) en 20 mL de etanol, esta mezcla se dejó en agitación hasta su completa disolución. Seguido de esto, se agregaron 0.96 mL de cloruro de tionilo (13.22 mmol, 1.1 eq) gota a gota, posteriormente se retiró el baño de hielo y se dejó reaccionar durante 8 horas a temperatura ambiente. La reacción se rotaevaporó obteniendo un líquido amarillo, el cual fue sometido a lavados con una solución saturada de bicarbonato de sodio (3 x 20 mL). El líquido obtenido fue purificado por cromatografía en columna, iniciando con hexano 100 hasta terminar con un sistema hexano:AcOEt 65:35, de este modo se obtuvo un líquido amarillo claro con un rendimiento del 94% (2.18 g) y con una sola mancha en ccf (Sistema II).

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 1.22 (d, 3H, CH₃), 2.59 (t, 2H, CH₂), 2.87 (t, 2H, CH₂), 4.12, c, 2H, CH₂), 6.74 (d, 2H, 2.09, 6.48, H-3A-H-5A), 7.03 (d, 2H, 6.54, H-2A, H-6A). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 14.2 (CH₃), 30.2 (CH₂), 36.3 (CH₂), 60.6 (CH₂), 115.4 (C-3A, C-5A), 129.4 (C-2A, C-6A), 154.3 (C-4A), 173.6 (C=O).

MS/EI: m/z (% int. rel). 194 (M⁺) 49%, 142 (M-74) 100%.

10.4.8 Síntesis de 3-[4-(bifenil-3-ilmetoxi)fenil]propanoato de etilo (18)



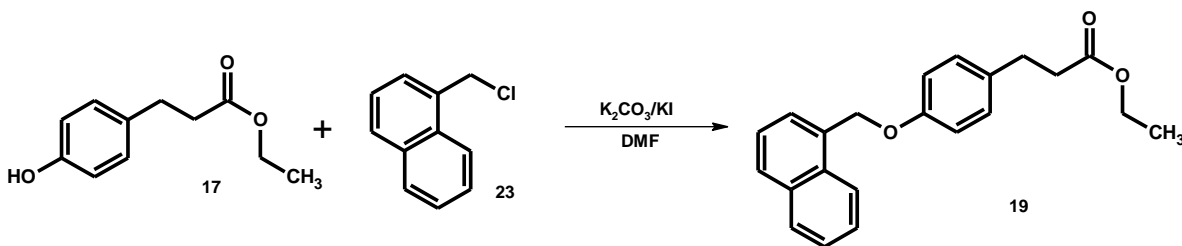
En un matraz redondo de 10 mL equipado con agitación magnética, baño de aceite y refrigerante en posición de reflujo, se adicionaron 0.3 g de 3-(4-hidroxifenil)propanoato de etilo (**17**) (1.53 mmol) y 0.43 g de carbonato de potasio (3.01 mmol, 2 eq) en 0.75 mL dimetilformamida (DMF). Esta mezcla se calentó a 40 °C durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se añadieron lentamente 0.42 g de 3-(bromometil)bifenilo (1.7 mmol, 1.1 eq) previamente disuelto en 0.75 mL de DMF dejando reaccionar a reflujo durante 26 horas. Seguido de esto, se filtró con vacío el crudo de la reacción para remover las sales derivadas de carbonato de potasio. La solución obtenida se concentró al alto vacío a 60°C y se agregaron 10 mL de agua fría y se llevó a cabo una extracción con AcOEt (3 x 15 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, obteniendo un líquido amarillo claro. Consecutivamente se purificó por cromatografía en columna, iniciando con hexano 100 hasta terminar con un sistema hexano:AcOEt 20:80 logrando un líquido incoloro (0.36 g) con un rendimiento de 65 % y con una sola mancha por ccf (Sistema IV).

1H -RMN ($CDCl_3$) δ : 1.21 (t, 3H, CH_3), 2.58 (t, 2H, CH_2), 2.88 (t, 2H, CH_2), 4.11 (c, 2H, CH_2), 5.08 (s, 2H, CH_2), 6.92 (d, 2H, $J = 7.8$, H-3A, H-5A), 7.11 (d, 2H, $J = 8.1$, H-2A, H-6A), 7.34 (t, 1H, $J = 7.56$, H-5B), 7.39 (d, 1H, 7.44, H-6B), 7.43–7.41 (m, 3H, H-3C, H-4C, H-5C), 7.54 (d, 1H, $J = 7.68$, H-4B), 7.58, (d, 2H, $J = 7.68$, H-2C, H-6C), 7.64 (s, 1H, H-2B) ppm.

^{13}C -RMN ($CDCl_3$) δ : 14.2 (CH_3), 30.1 (CH_2), 36.2 (CH_2), 60.3 (CH_2), 70.1 (CH_2), 114.9 (C-3A, C-5A), 126.2 (C-4B), 126.3 (C-2B), 126.7 (C-BB), 127.2 (C-2C, C-6C), 127.4 (C-5B), 128.9 (C-3C, C-5C), 129 (C-4C), 129.3 (C-2A, C-6A), 133.0 (C-1A), 137.7 (C-1C), 140.9 (C-1B), 141.5 (C-3B), 157.2 (C-4A), 172.9 (C=O) ppm.

MS/EI: m/z (% int. rel). 360(M⁺) 31%, 167(M-193) 100%.

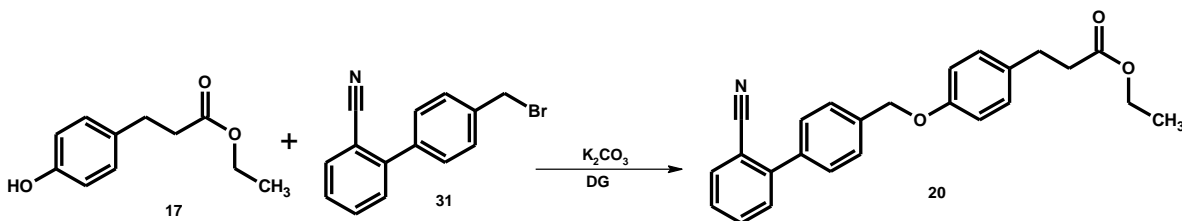
10.4.9 Síntesis de 3-[4-(1-naftilmetoxi)fenil]propanoato de etilo (19)



En un matraz redondo de 10 mL equipado con agitación magnética, baño de aceite y refrigerante en posición de reflujo, se adicionaron 0.3 g de 3-(4-hidroxifenil)propanoato de etilo (**17**) (1.53 mmol) y 0.43 g de carbonato de potasio (3.01 mmol, 2 eq) en 0.75 mL dimetilformamida (DMF). Esta mezcla se calentó a 40 °C durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se añadieron lentamente 0.3 g de 1-(clorometil)naftaleno (1.7 mmol, 1.1 eq) previamente disuelto en 0.75 mL de DMF dejando reaccionar a reflujo durante 6 horas. Seguido de esto, se filtró con vacío el crudo de la reacción para remover las sales derivadas de carbonato de potasio. La solución obtenida se concentró al alto vacío a 60°C y se agregaron 10 mL de agua fría y se llevó a cabo una extracción con AcOEt (3 x 15 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, obteniendo un líquido amarillo. Consecutivamente se purificó por cromatografía en columna, iniciando con hexano 100 hasta terminar con un sistema hexano:AcOEt 20:80 logrando un líquido incoloro (0.40 g) con un rendimiento de 78% y con una sola mancha por ccf (Sistema I).

1H -RMN ($CDCl_3$) δ : 1.23 (t, 3H, CH_3), 2.59 (t, 2H, CH_2) 2.90 (t, 2H, CH_2) 4.12 (c, 2H, CH_2'), 5.44 (s, 2H, CH_2), 6.97 (d, 2H, 7.14, H-3A, H-5A) 7.14 (d, 2H, J = 7.68, H-2A, H-6A) 7.44 (t, 1H, J = 8.22, J = 8.28, H-3') 7.52–7.49 (m, 2H, H-6', H-7') 7.57 (d, 1H, J = 6.9, H-2') 7.83 (d, 1H, J = 8.22, H-4') 7.85 (d, 1H, J = 7.5, H-5') 8.03 (d, J = 7.86, H-8') ppm. ^{13}C -RMN ($CDCl_3$) δ : 14.2 (CH_3), 30.2 (CH_2), 36.2 (CH_2), 60.4 (CH_2'), 68.7 (CH_2), 114.9 (C-3A, C-5A), 123.7 (C-8'), 125.3 (C-3'), 125.9 (C-6'), 126.5 (C-7'), 128.7 (C-2'), 128.9 (C-5'), 129.3 (C-2A, C-6A), 131.5 (C-4'), 132.4 (C-8a), 133.1 (C-4a), 133.7 (C-1'), 157.4 (C-4a), 172.9 (C=O) ppm. MS/EI: m/z (% int. rel). 334 (M+) 11%, 141(M-193) 100%.

10.4.10 Síntesis de 3-{4-[(2'-cianobifenil-4-il)metoxi]fenil}propanoato de etilo (20)

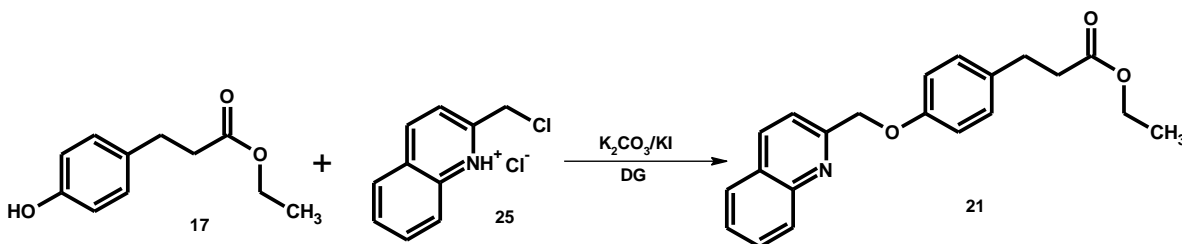


En un matraz redondo de 25 mL equipado con agitación magnética, baño de aceite y refrigerante en posición de reflujo, se adicionaron 0.6 g de 3-(4-hidroxifenil)propanoato de etilo (**17**) (3.1 mmol) y 0.94 g de carbonato de potasio (6.2 mmol, 2 eq) en 1.5 mL diglima (DG). Esta mezcla se calentó a 40 °C durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se añadieron lentamente 0.84 g de 4'-(bromometil)bifenil-2-carbonitrilo (1.7 mmol, 1.1 eq) previamente disuelto en 1.5 mL de DG dejando reaccionar a reflujo durante 5 horas. Seguido de esto, se filtró con vacío el crudo de la reacción para remover las sales derivadas de carbonato de potasio. La solución obtenida se concentró al alto vacío a 60°C y se agregaron 10 mL de agua fría y se llevó a cabo una extracción con AcOEt (3 x 15 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, obteniendo un líquido beige. Consecutivamente se purificó por cromatografía en columna, iniciando con hexano 100 hasta terminar con un sistema hexano:AcOEt 70:30 logrando un líquido incoloro. Posteriormente se obtuvieron cristales blancos por evaporación lenta del disolvente con un rendimiento de 64 %, punto de fusión de 66.6-68.6 °C y con una sola mancha por ccf (Sistema I).

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6) δ : 1.14 (t, 3H, CH_3), 2.56 (t, 2H, CH_2) 2.78 (t, 2H, CH_2) 4.03, (c, 2H, CH_2'), 5.16 (s, 2H, CH_2) 6.96 (d, 2H, $J = 8.04$, H-3A, H-5A) 7.15 (d, 2H, $J = 8.04$, H-2A, H-6A), 7.64-7.60 (m, 6H, H-2A, H-3A, H-5A, H-6A, H-4C, H-6C), 7.79 (t, 1H, $J = 7.56$, H-5C) 7.95 (d, 1H, $J = 7.68$, H-3C) ppm. $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6) δ :14.5 (CH_3), 29.1 (CH_2), 35.8 (CH_2), 60.2 (CH_2'), 69.1 (CH_2), 110.6 (C-2C), 115 (C-3A, C-5A), 119 (CN), 128.7 (C-4C), 129.2 (C-2B, C-6B), 129.7 (C-2A, C-6A), 130.5 (C-6C), 133.2 (C-1A), 134 (C-5C), 134.3 (C-3C), 137.7 (C-4B), 138.3 (C-1B), 144.7 (C-1C), 157.2 (C-4A), 172.5 (C=O) ppm.

MS/EI: m/z (% int. rel). 385 (M+) 11%, 192 (M-193) 100%.

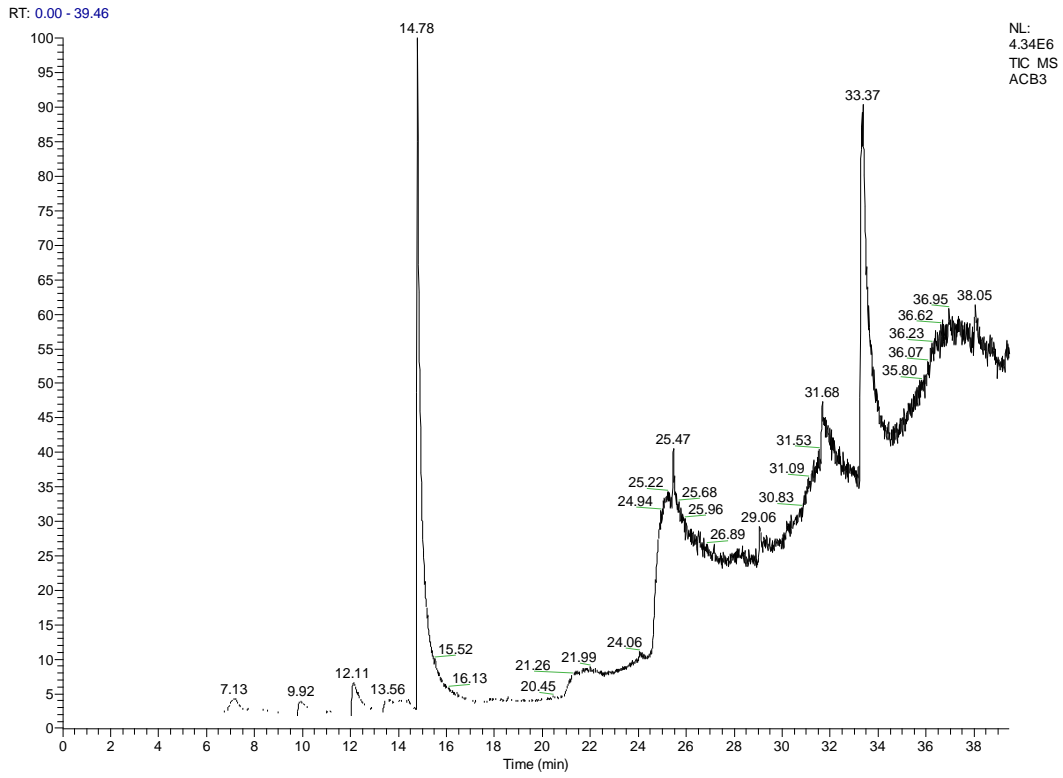
10.4.11 Síntesis de 3-[4-(quinolin-2-ilmetoxi)fenil]propanoato de etilo (21)



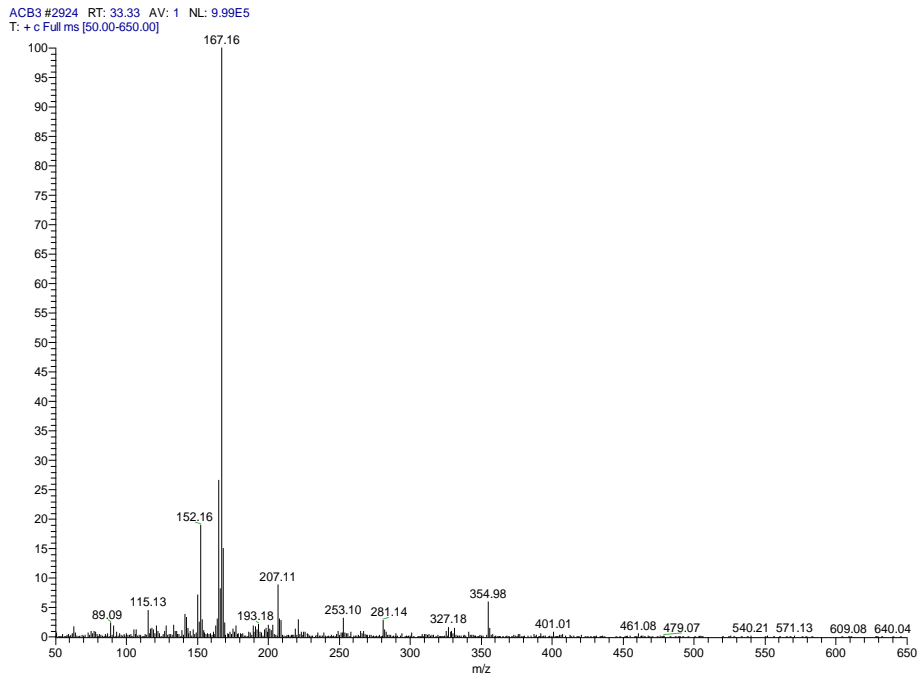
En un matraz redondo de 25 mL equipado con agitación magnética, baño de aceite y refrigerante en posición de reflujo, se adicionaron 0.63 g de 3-(4-hidroxifenil)propanoato de etilo (**17**) (3.24 mmol) y 1.34 g de carbonato de potasio (9.7 mmol, 3 eq) en 1.5 mL diglima (DG). Esta mezcla se calentó a 40 °C durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se añadieron lentamente 0.83 g de cloruro de 2-(clorometil)quinolinio (3.87 mmol, 1.1 eq) previamente disuelto en 1.5 mL de DG dejando reaccionar a reflujo durante 9 horas. Seguido de esto, se filtró con vacío el crudo de la reacción para remover las sales derivadas de carbonato de potasio. La solución obtenida se concentró al alto vacío a 60°C y se agregaron 15 mL de agua fría y se llevó a cabo una extracción con AcOEt (3 x 15 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, obteniendo un líquido amarillo. Consecutivamente se purificó por cromatografía en columna, iniciando con hexano 100 hasta terminar con Un sistema hexano:AcOEt 80:20 logrando un líquido amarillo claro con un rendimiento de 72 % y con una sola mancha por ccf (Sistema III).

1H -RMN ($CDCl_3$) δ : 1.47 (t, 3H, CH_3), 2.50 (t, 2H, CH_2), 2.75 (t, 2H, CH_2), 4.01 (c, 2H, CH_2), 5.32 (s, 2H, CH_2), 6.96 (d, 2H, $J = 6.66$, $J = 8.67$, H-3A, H-5A), 7.13 (d, 2H, $J = 8.58$, H-2A, H-6A), 7.62 (d, 1H, $J = 7.35$, H-6'), 7.65 (d, 1H, $J = 8.49$, H-3'), 7.79 (dd, 1H, $J = 8.28$, H-7'), 7.97 (dd, 1H, $J = 8.85$, H-5'), 8.01 (dd, 1H, $J = 8.64$, H-4'), 8.39 (d, 1H, 8.55, H-80). ^{13}C RMN($CDCl_3$) δ : 14.0 (CH_3), 29.4 (CH_2), 35.4 (CH_2), 59.7 (CH_2'), 70.7 (CH_2), 114.6 (C-3A, C-5A), 119.5 (C-3'), 127.1 (C-6'), 128.1 (C-4'), 128.5 (C-4a), 129.1 (C-7'), 129.8 (C-2A, C-6A), 130.5 (C-5'), 132.9 (C-1A), 137.9 (C-8'), 146.9 (C-8a), 158.7 (C-2'), 172.1 (C=O) ppm. MS/EI: m/z (% int.rel). 335 (M+) 10%.

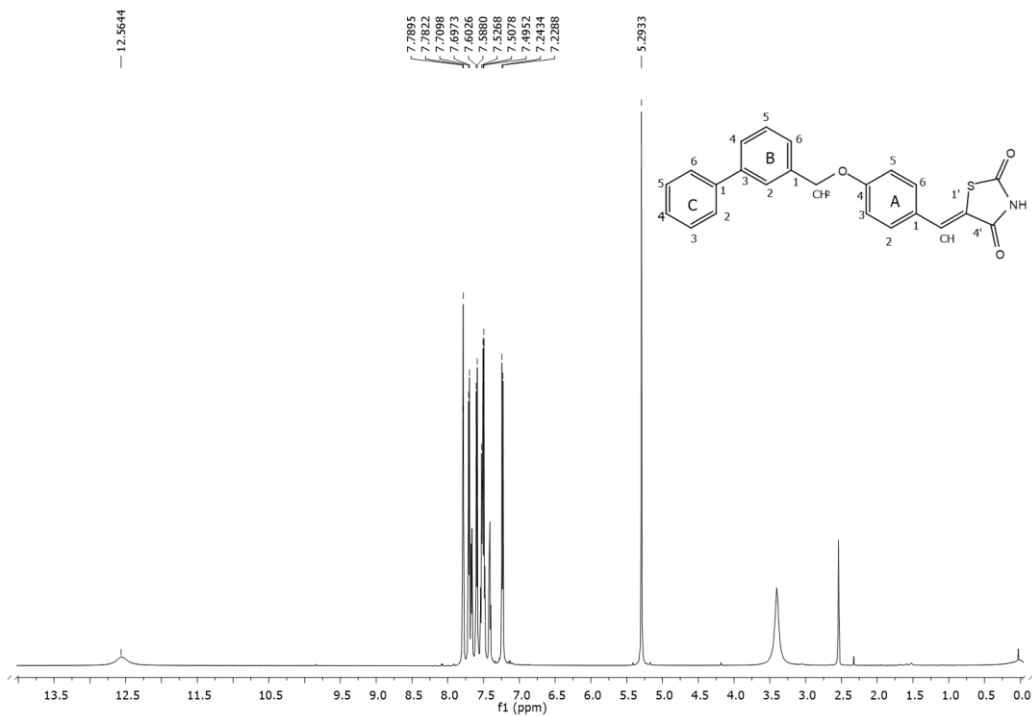
12. ESPECTROS



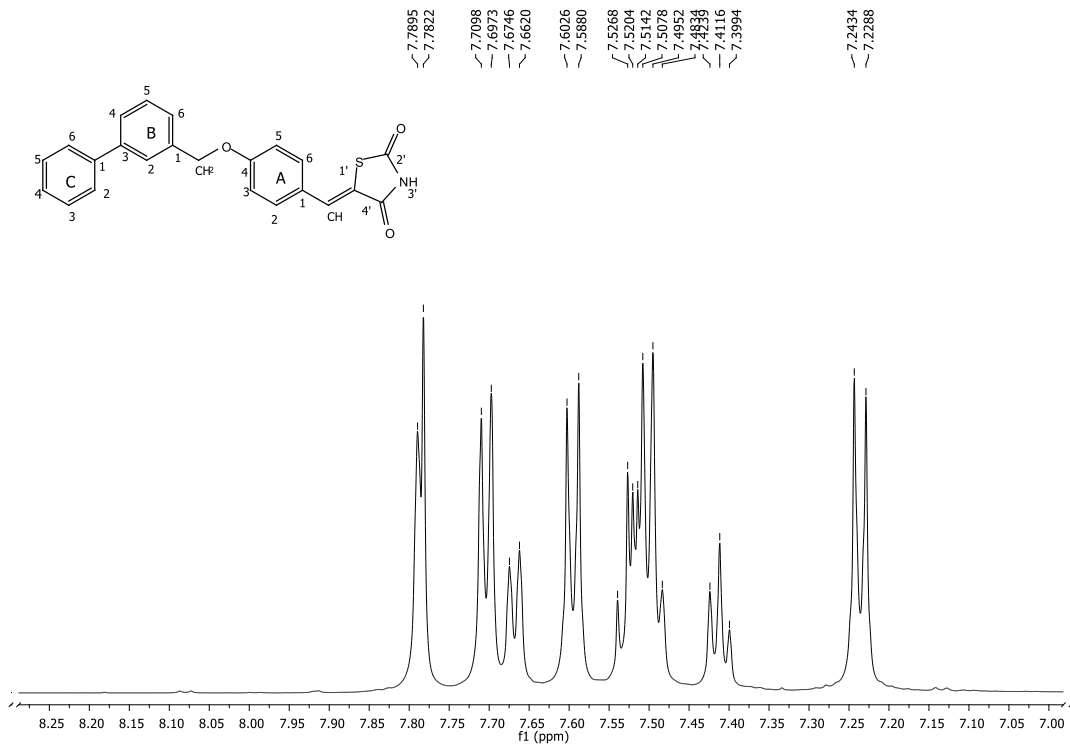
Espectro 1. Cromatograma compuesto ACB-1



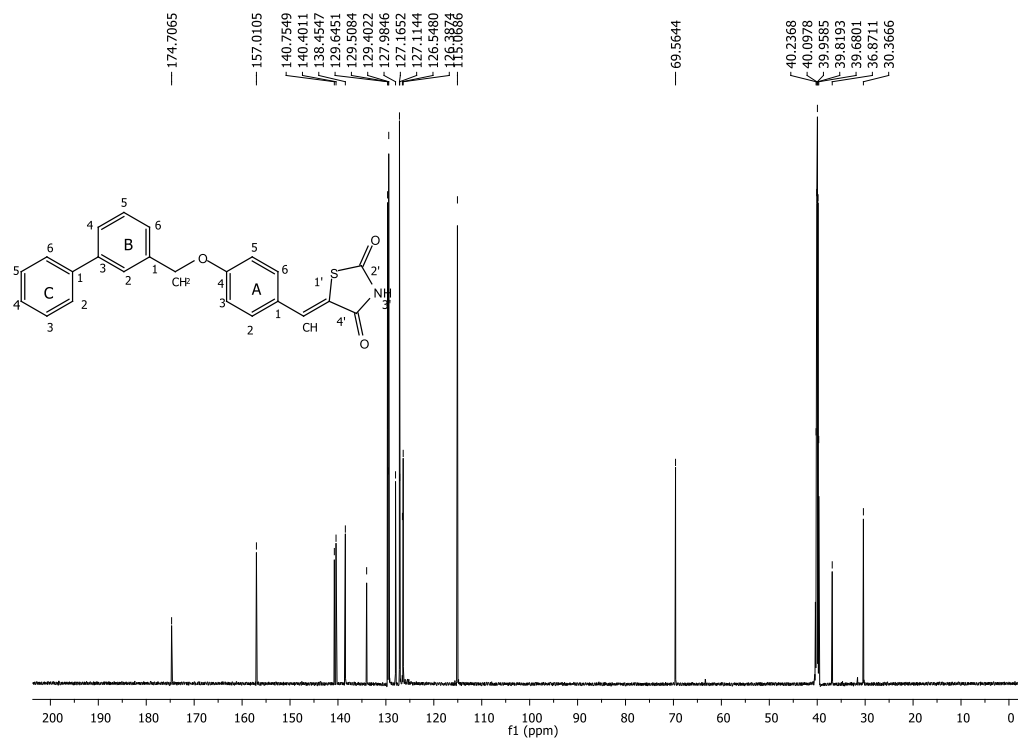
Espectro 2. Patrón de fragmentación del compuesto ACB-1 modalidad IE



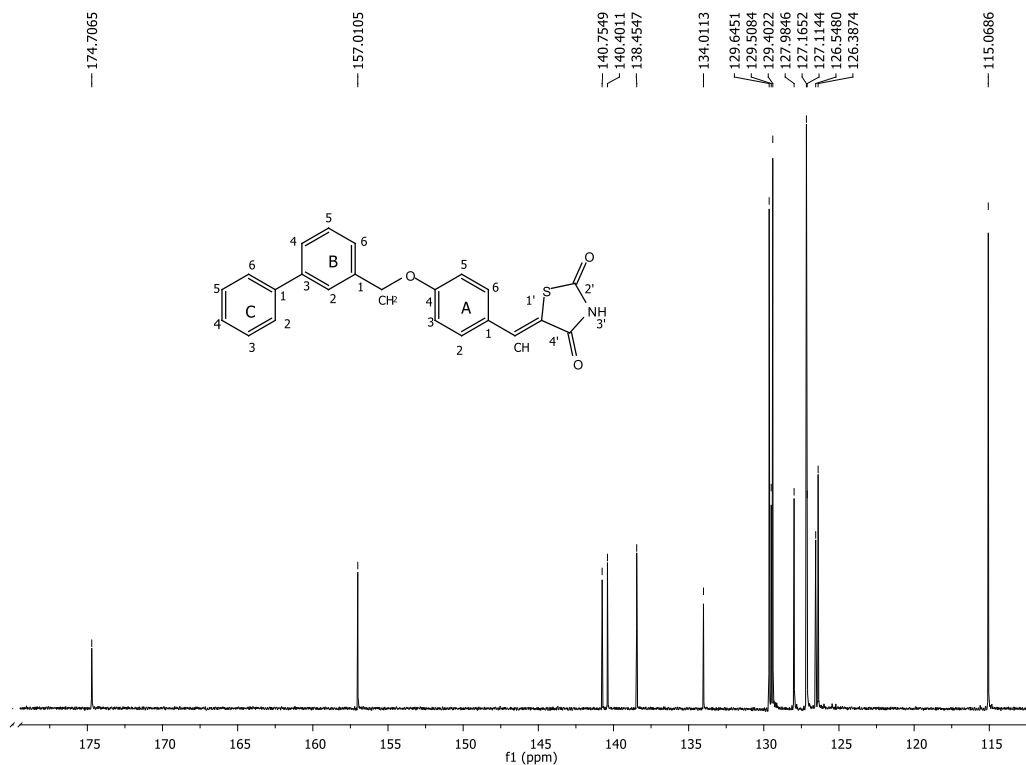
Espectro 3. Espectro RMN ¹H del compuesto ACB-1



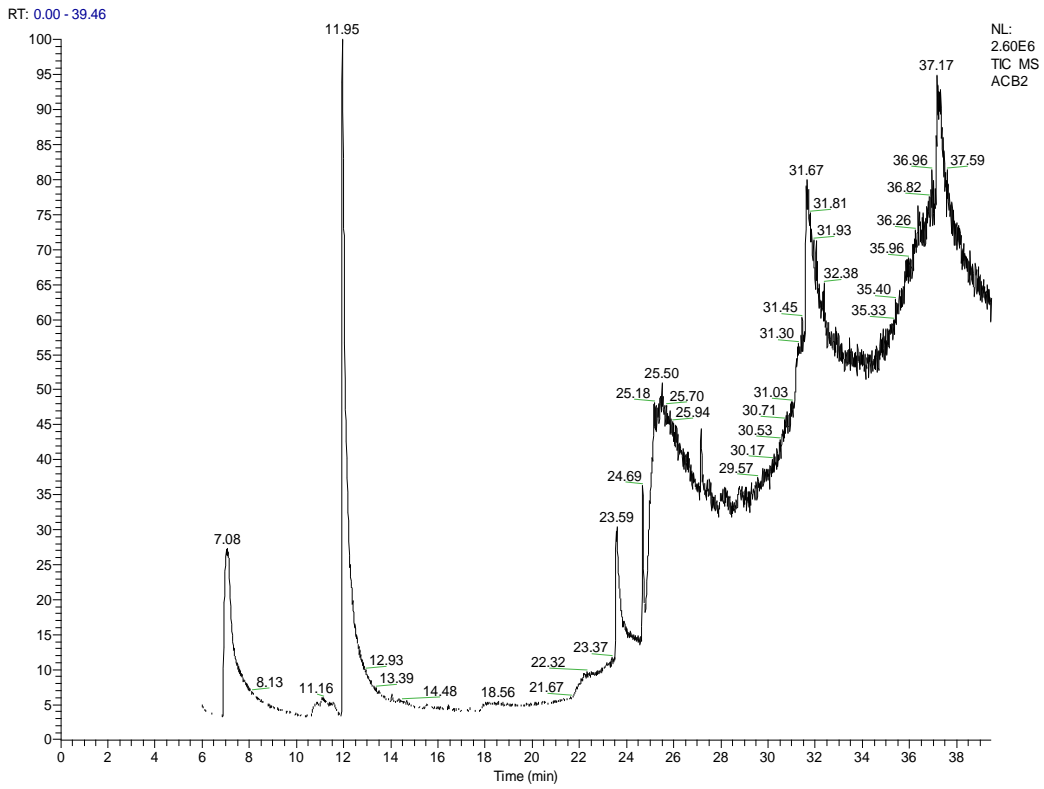
Espectro 4. Expansión de la zona aromática del espectro RMN ¹H del compuesto ACB-1



Espectro 5. Espectro RMN ^{13}C del compuesto ACB-1.

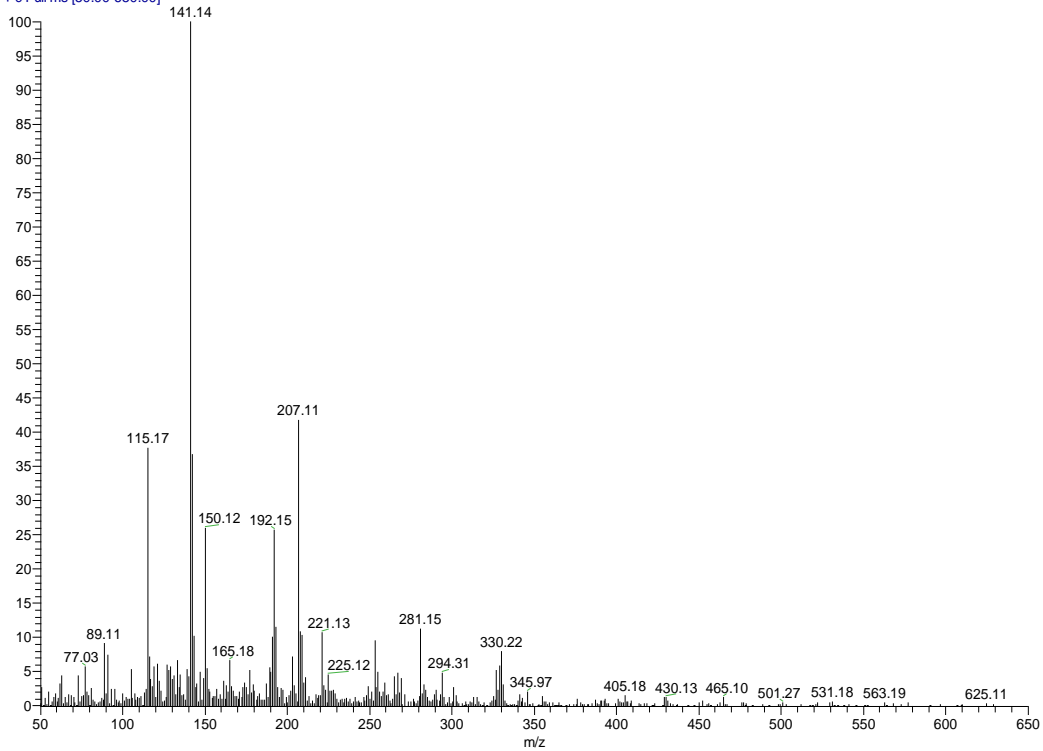


Espectro 6. Expansión de la zona aromática del espectro RMN ^{13}C del compuesto ACB-1.

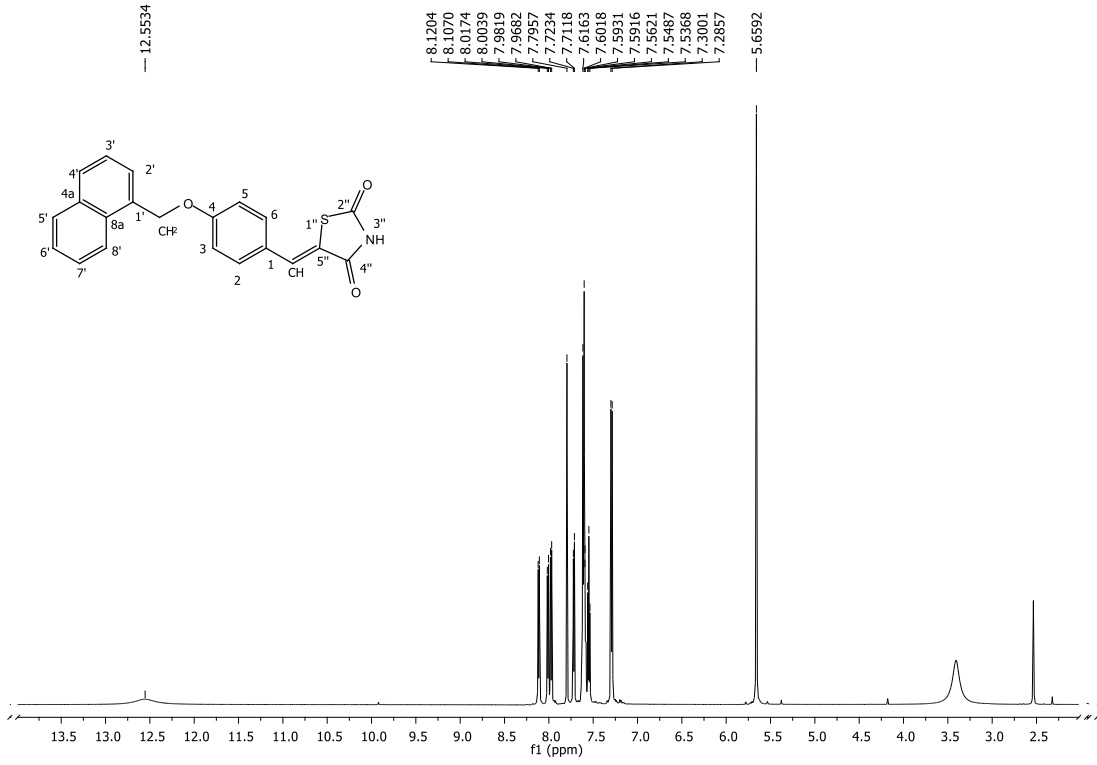


Espectro 7. Cromatograma del compuesto ACB-2

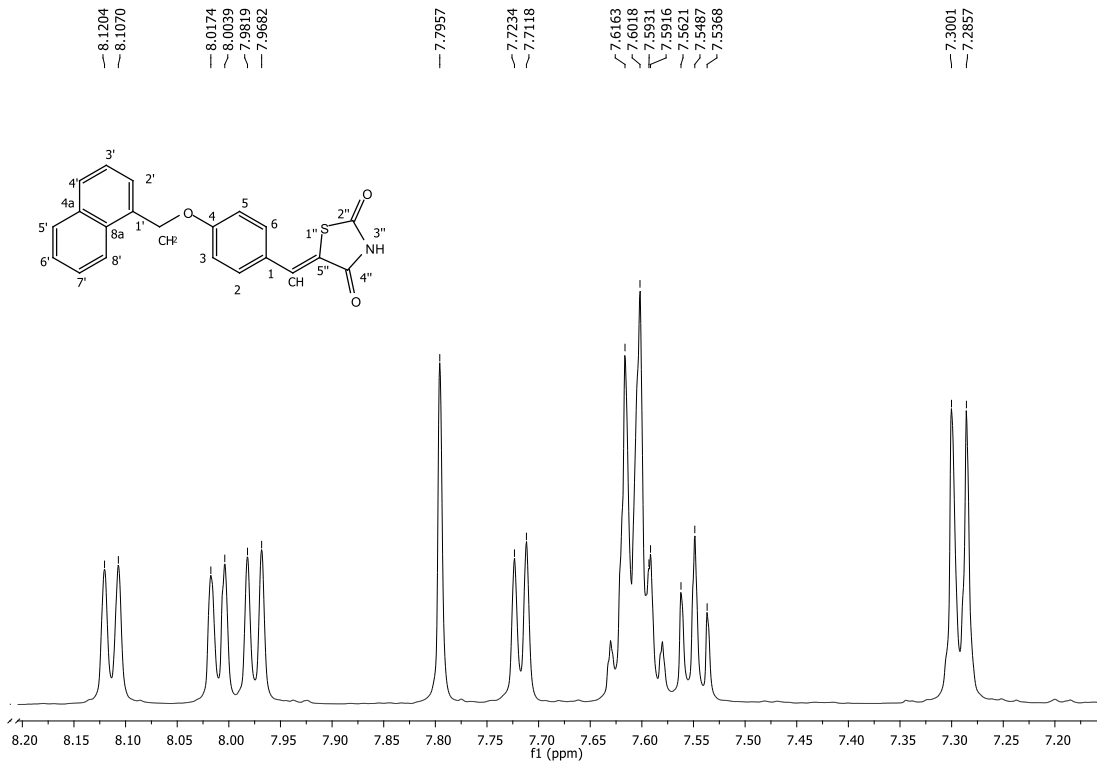
ACB2 #2749 RT: 31.69 AV: 1 NL: 2.22E5
T: + c Full ms [50.00-650.00]



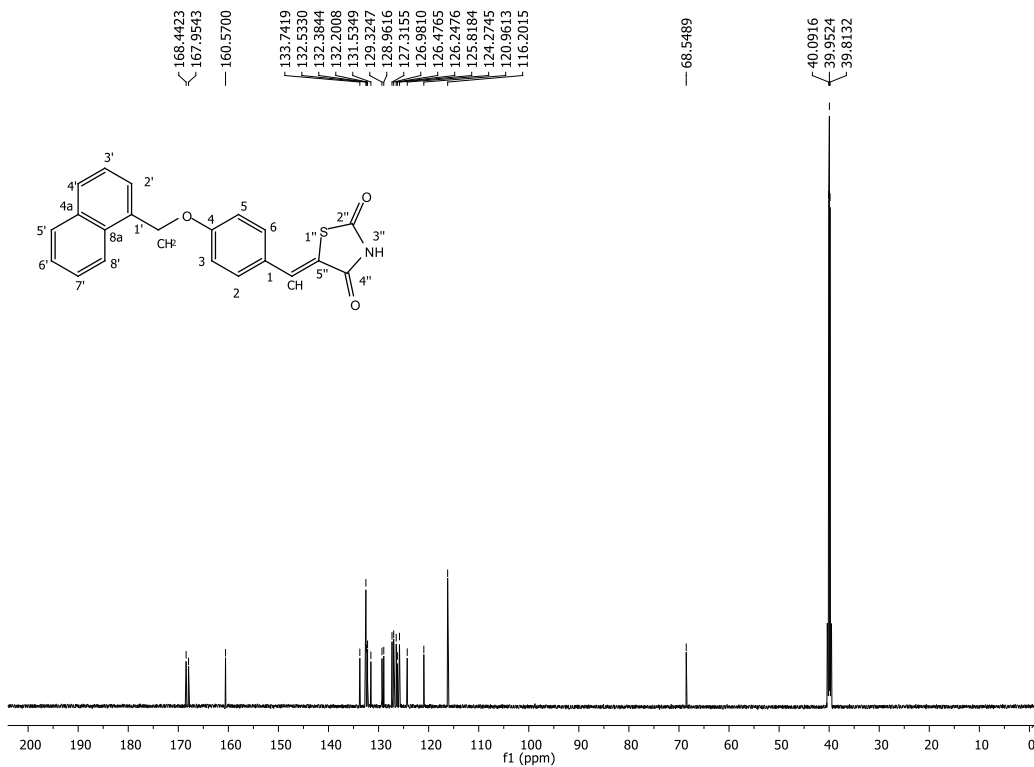
Espectro 8. Patrón de fragmentación del compuesto ACB-2 modalidad IE



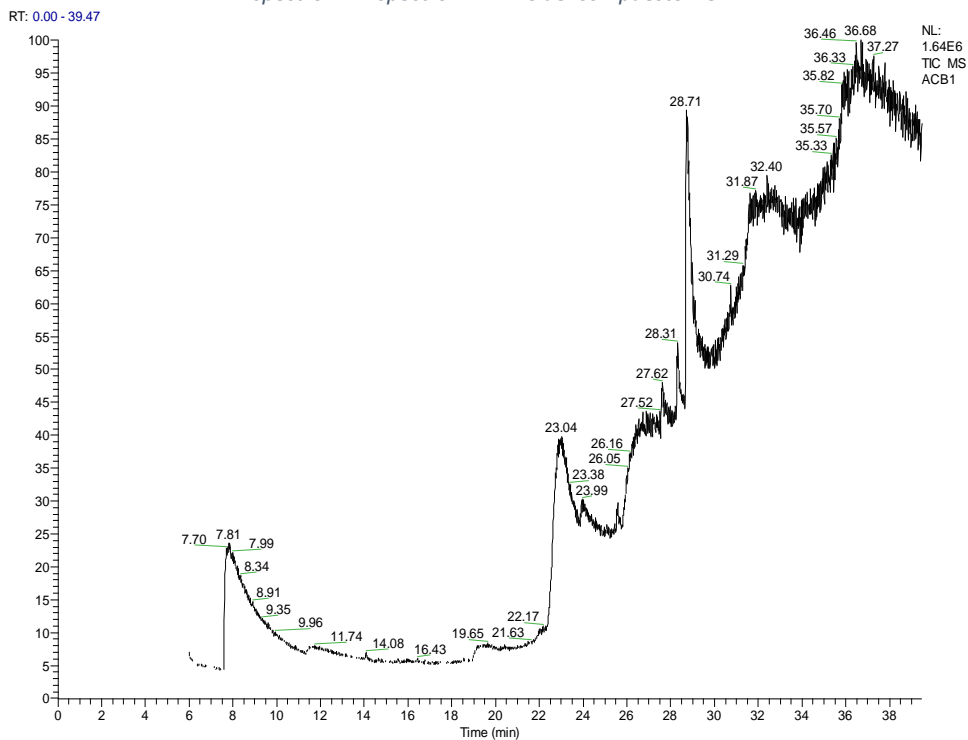
Espectro 9. Espectro RMN ¹H del compuesto ACB-2.



Espectro 10. Expansión de la zona aromática del espectro RMN ¹H del compuesto ACB-2.

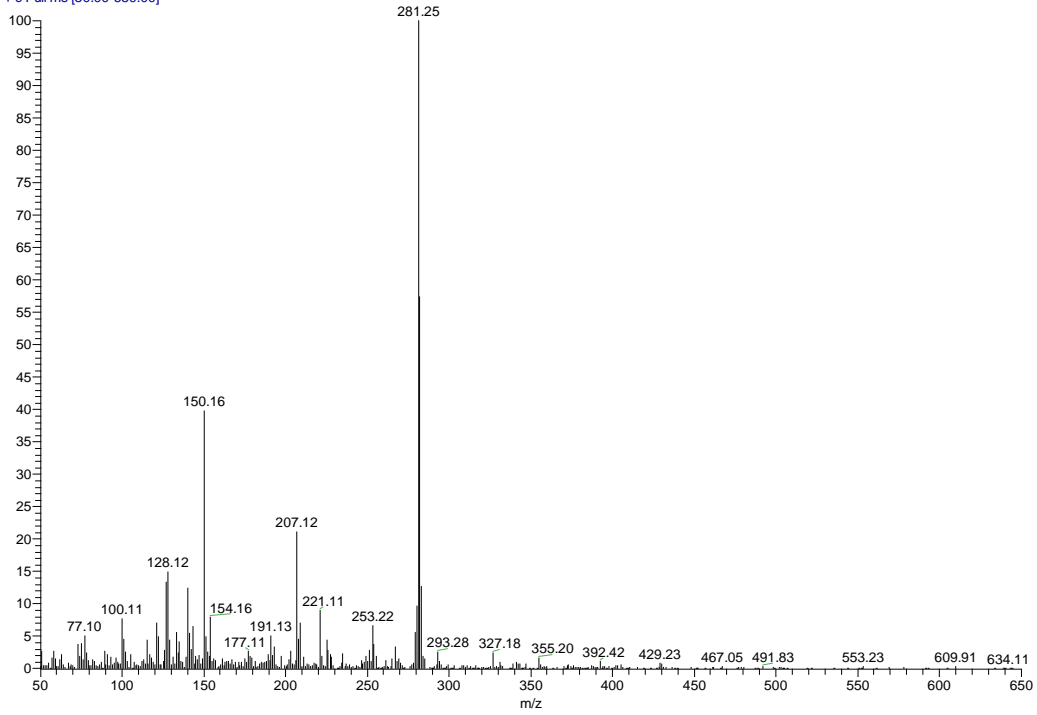


Espectro 11. Espectro RMN ¹³C del compuesto ACB-2.

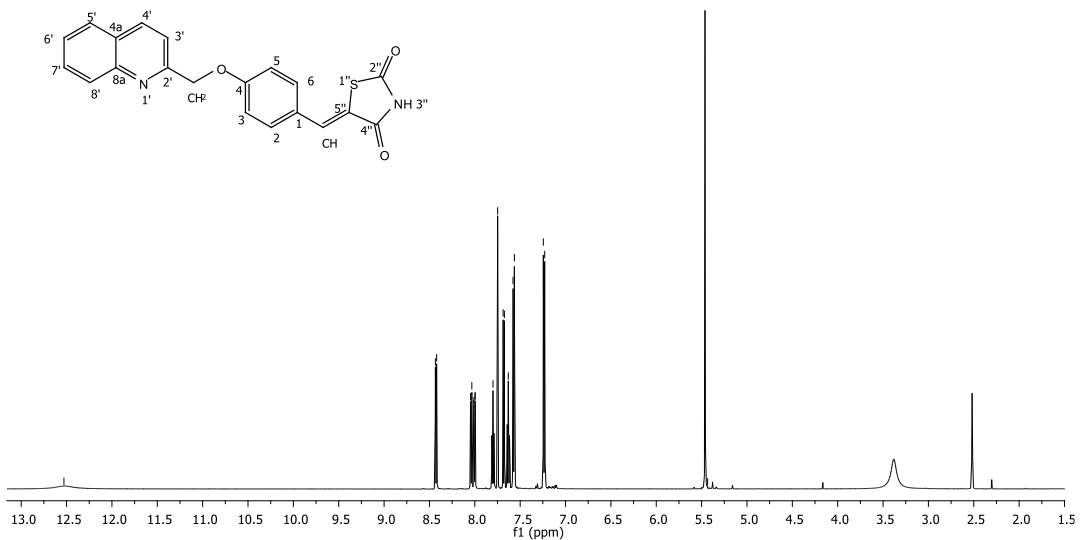


Espectro 12. Cromatograma del compuesto ACB-3

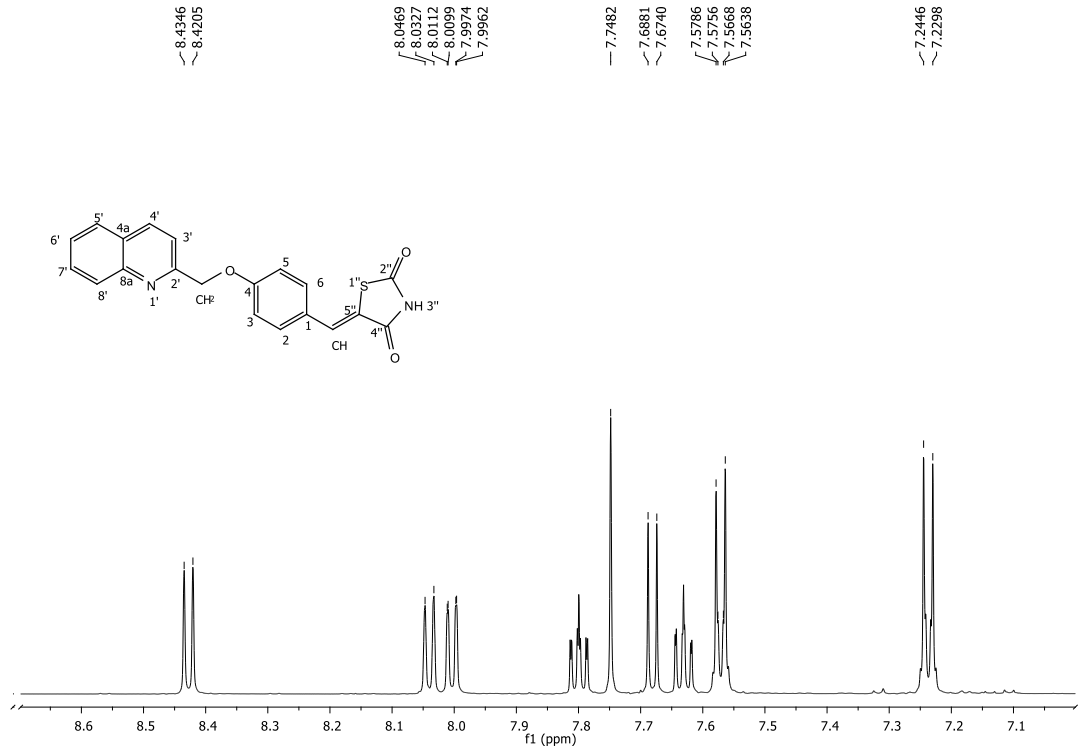
ACB1 #2431 RT: 28.81 AV: 1 NL: 2.03E5
T: + c Full ms [50.00-650.00]



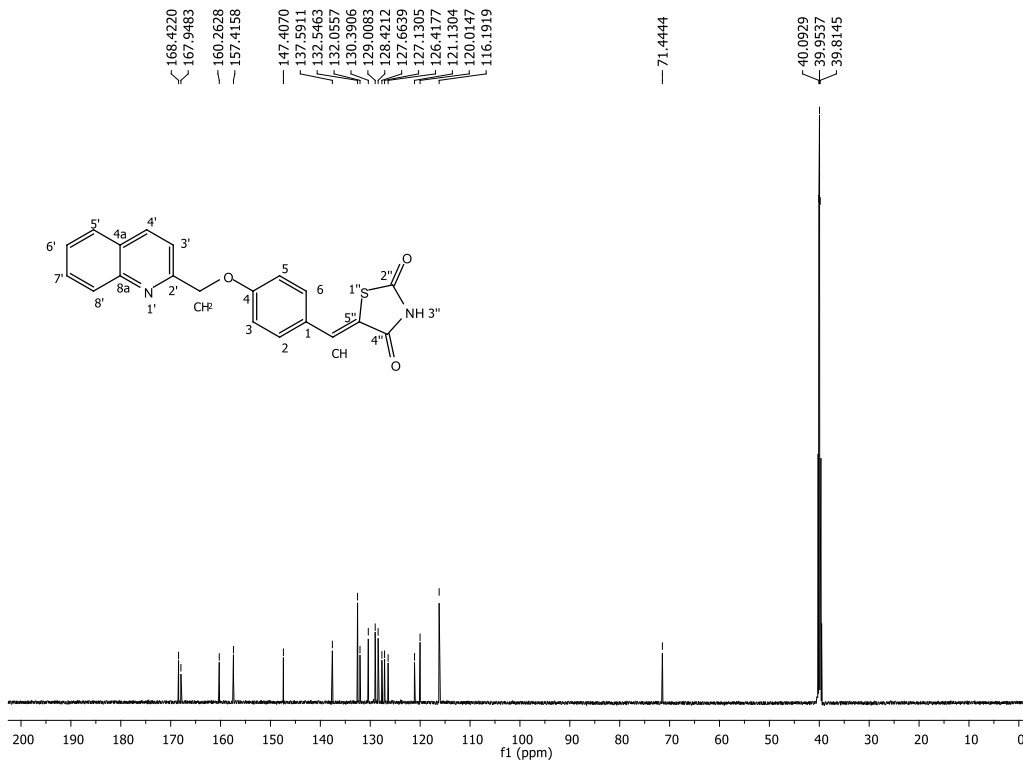
Espectro 13. Patrón de fragmentación del compuesto **ACB-3** modalidad IE



Espectro 14. Espectro RMN ¹H del compuesto **ACB-3**.

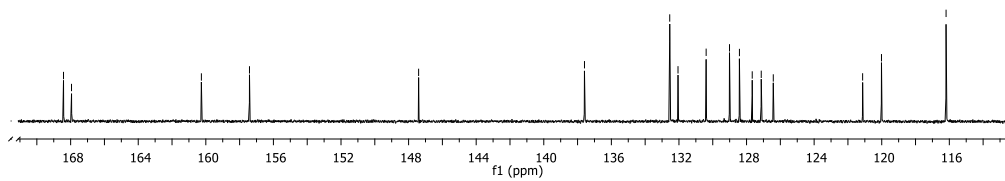
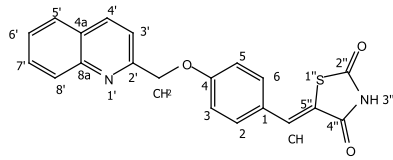


Espectro 15. Expansión de la zona aromática RMN ¹H del compuesto ACB-3.



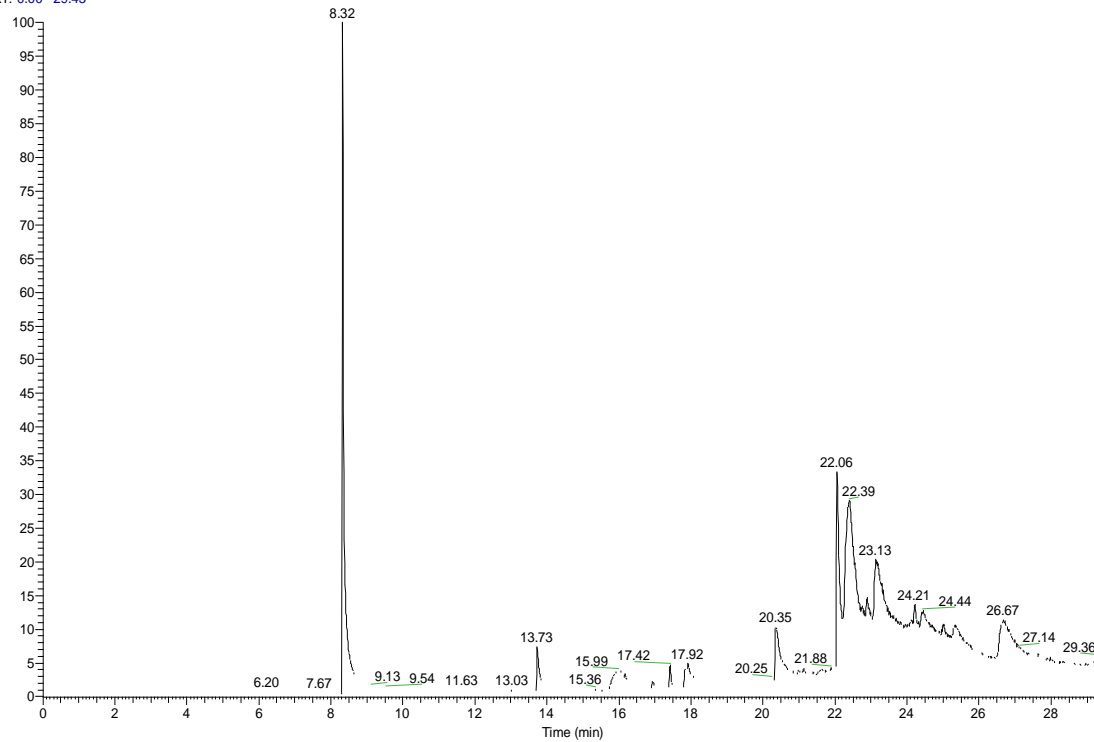
Espectro 16. Espectro RMN ¹³C del compuesto ACB-3.

- 168.4220
- 167.9463
- 160.2628
- 157.4158
- 147.4070
- 137.5911
- 132.5463
- 132.0557
- 130.3906
- 129.0083
- 128.4212
- 127.6639
- 127.1305
- 126.4177
- 121.1304
- 120.0147
- 116.1919



Spectro 17. Expansión de la zona aromática RMN ¹³C del compuesto ACB-3

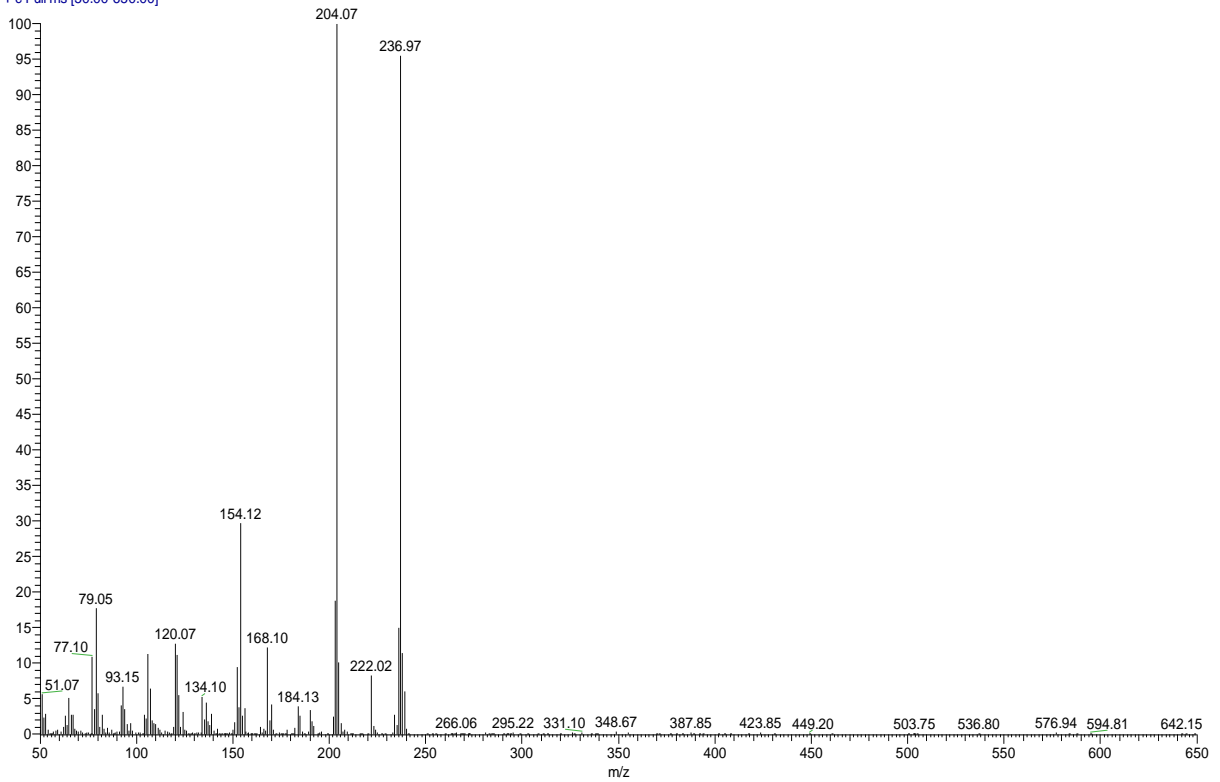
RT: 0.00 - 29.43



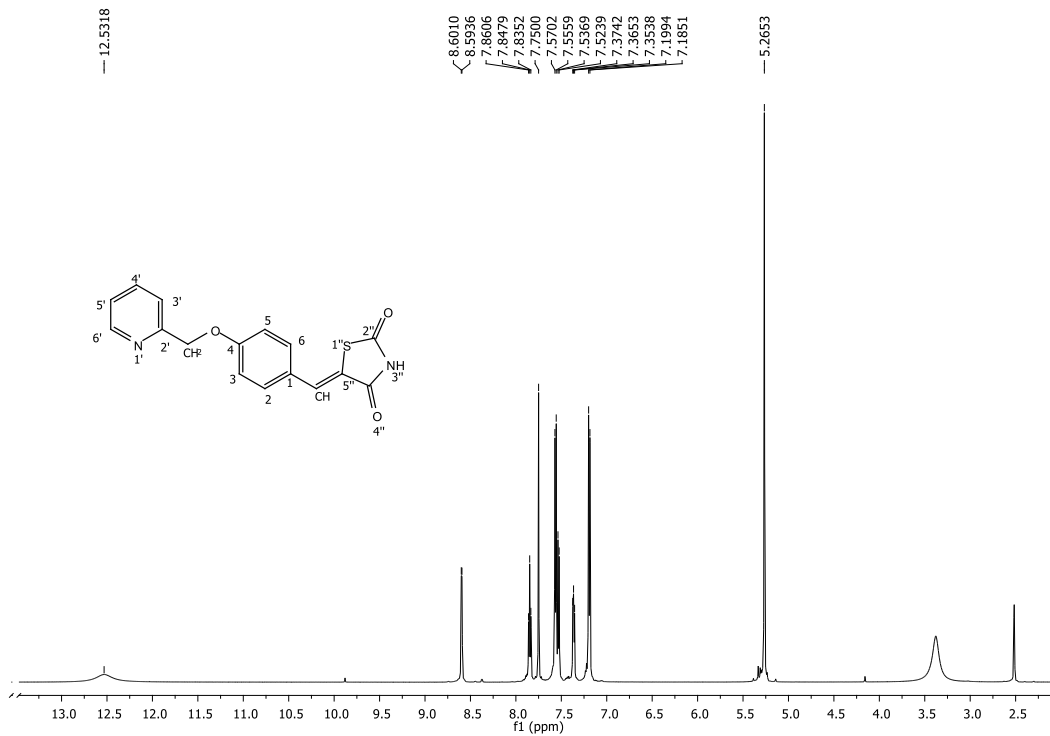
NL:
2.85E7
TIC MS
ACB-4

Spectro 18. Cromatograma del compuesto ACB-4

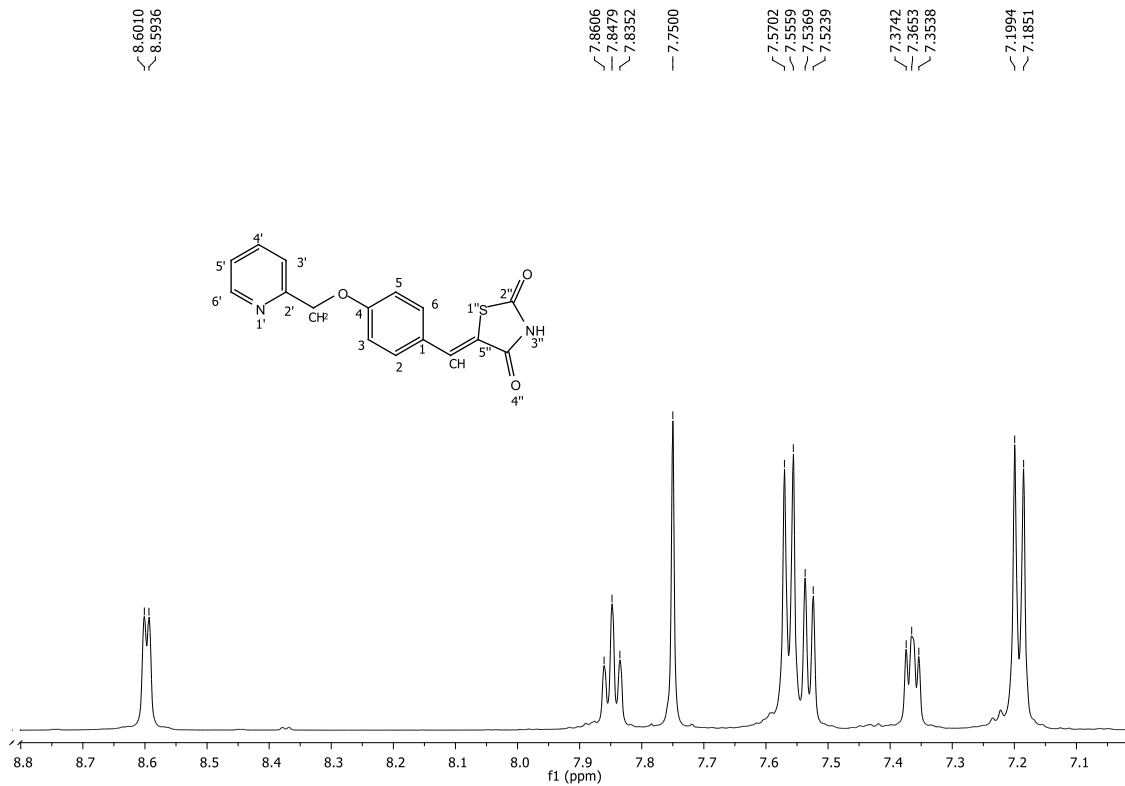
ACB-4 #248 RT: 8.38 AV: 1 NL: 1.21E6
T: + c Full ms [50.00-650.00]



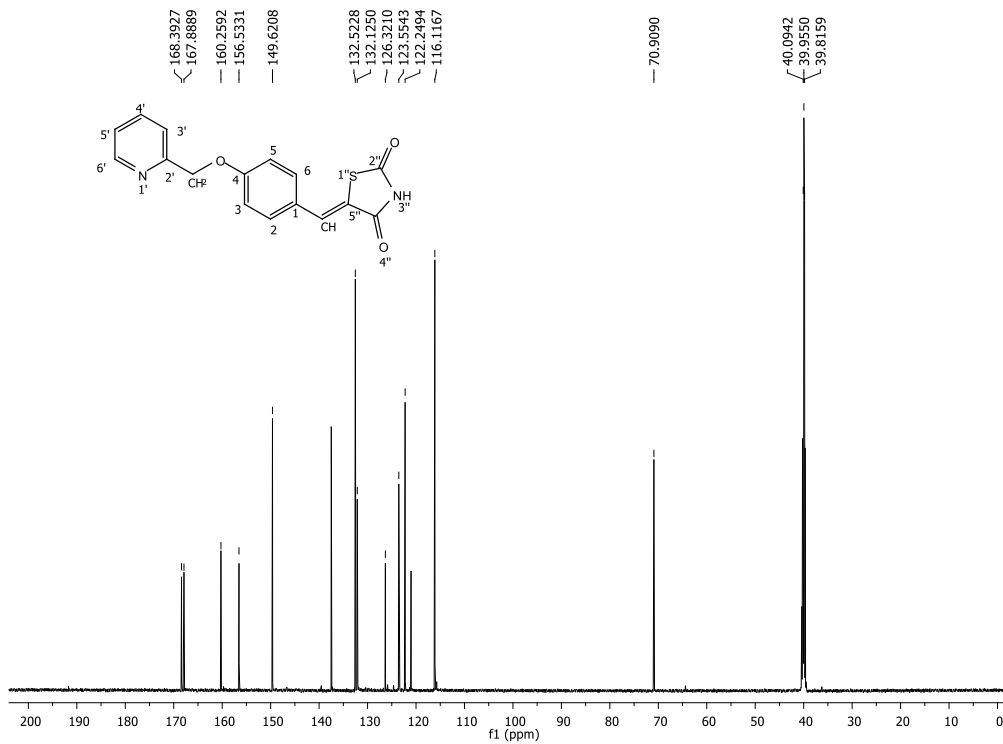
Espectro 19. Patrón de fragmentación del compuesto ACB-4 modalidad IE



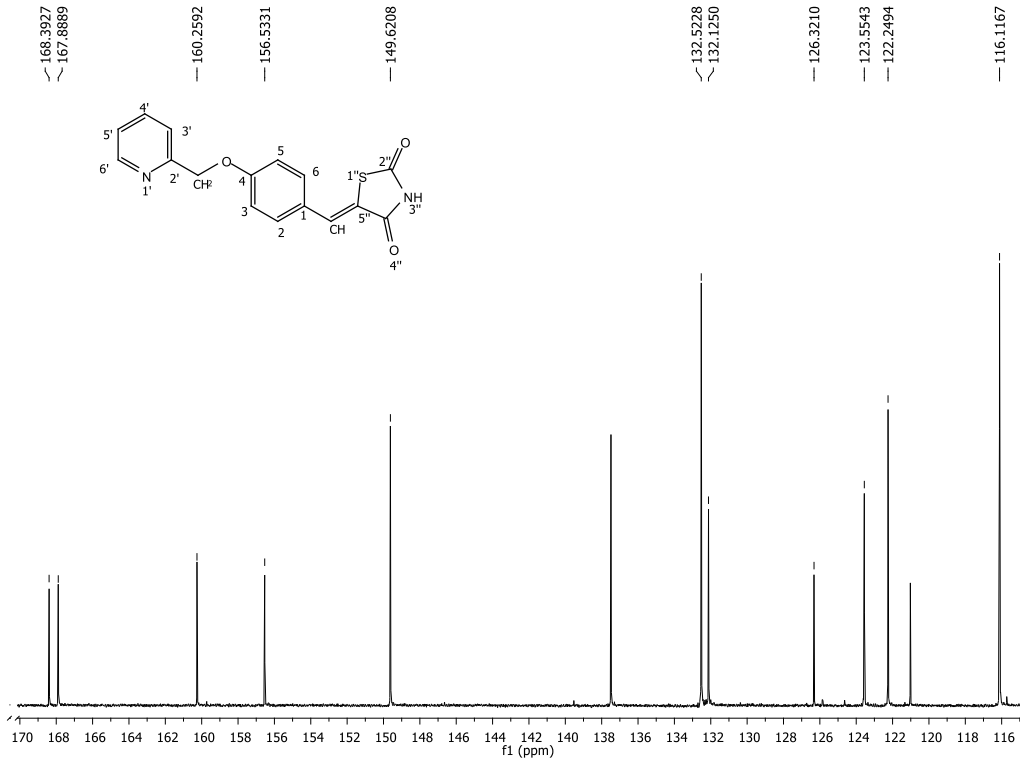
Espectro 20. Espectro RMN ¹H del compuesto ACB-4.



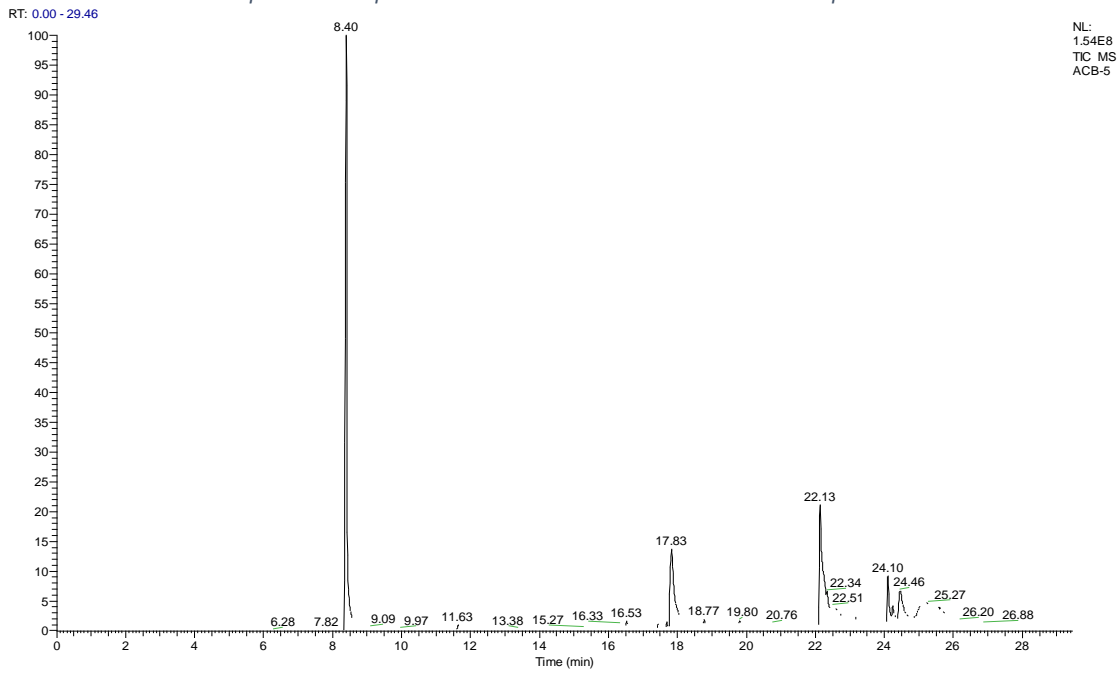
Espectro 21. Expansión de la zona aromática RMN ¹H del compuesto ACB-4



Espectro 22. Espectro RMN ¹³C del compuesto ACB-4

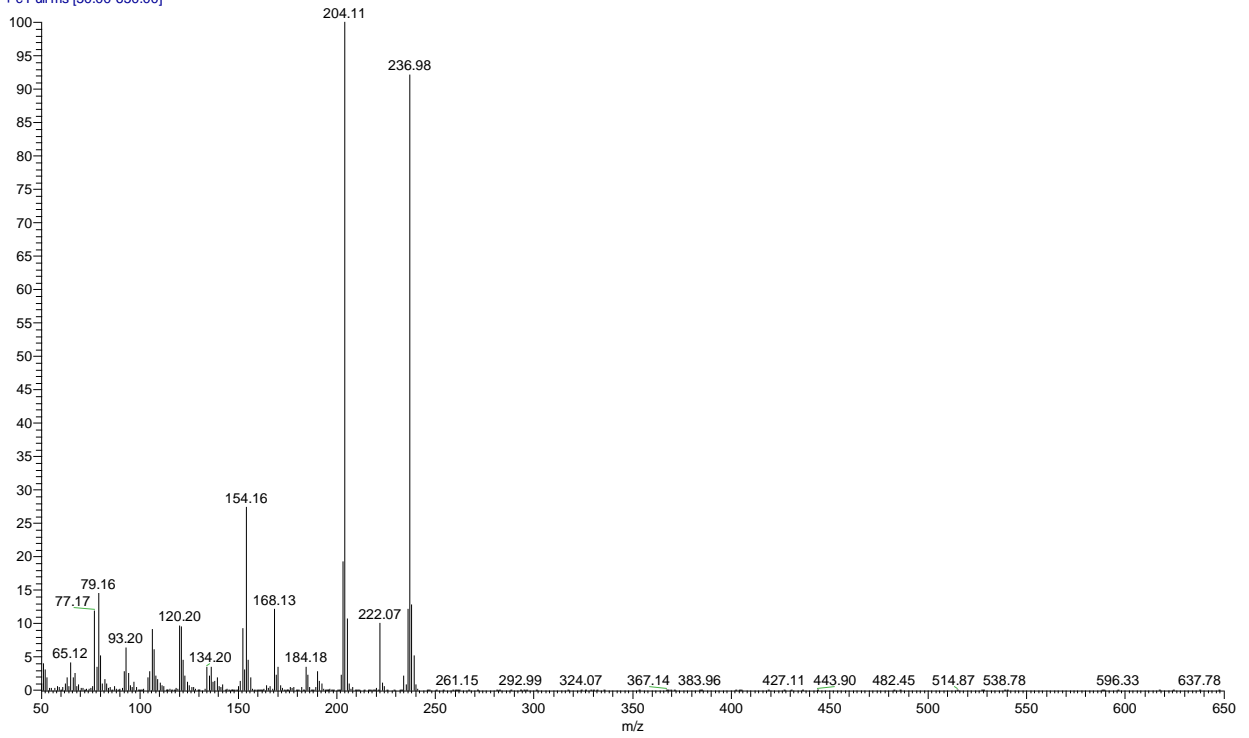


Espectro 23. Expansión de la zona aromática RMN ¹³C del compuesto ACB-4

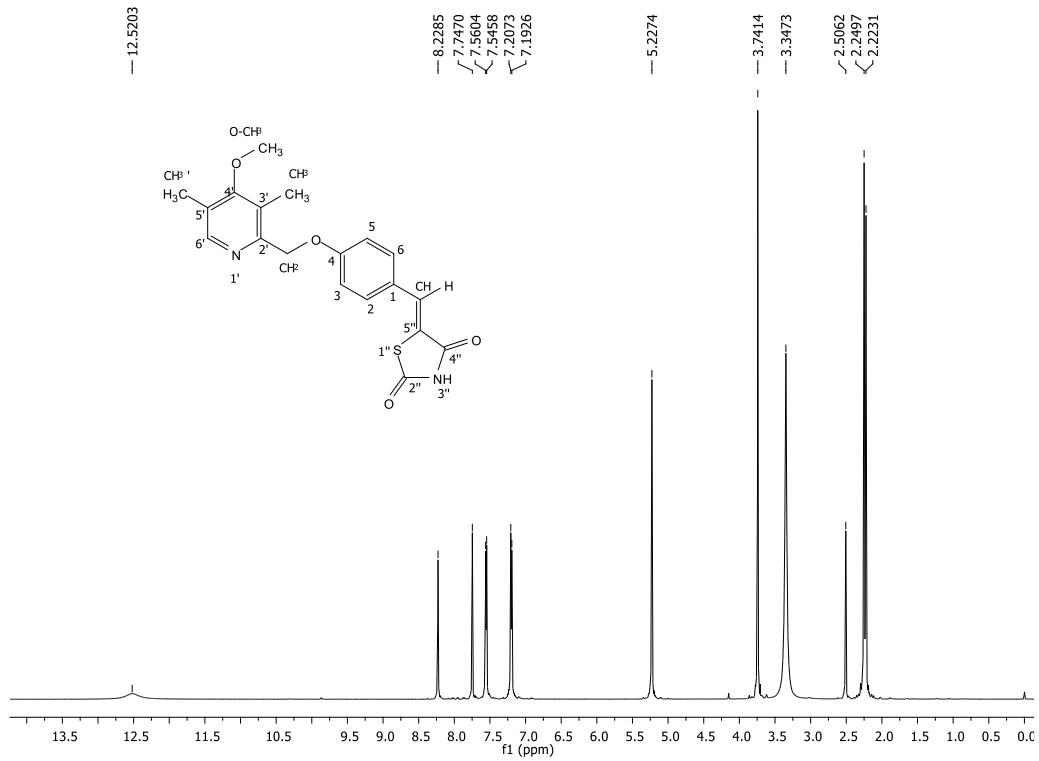


Espectro 24. Cromatograma del compuesto ACB-5

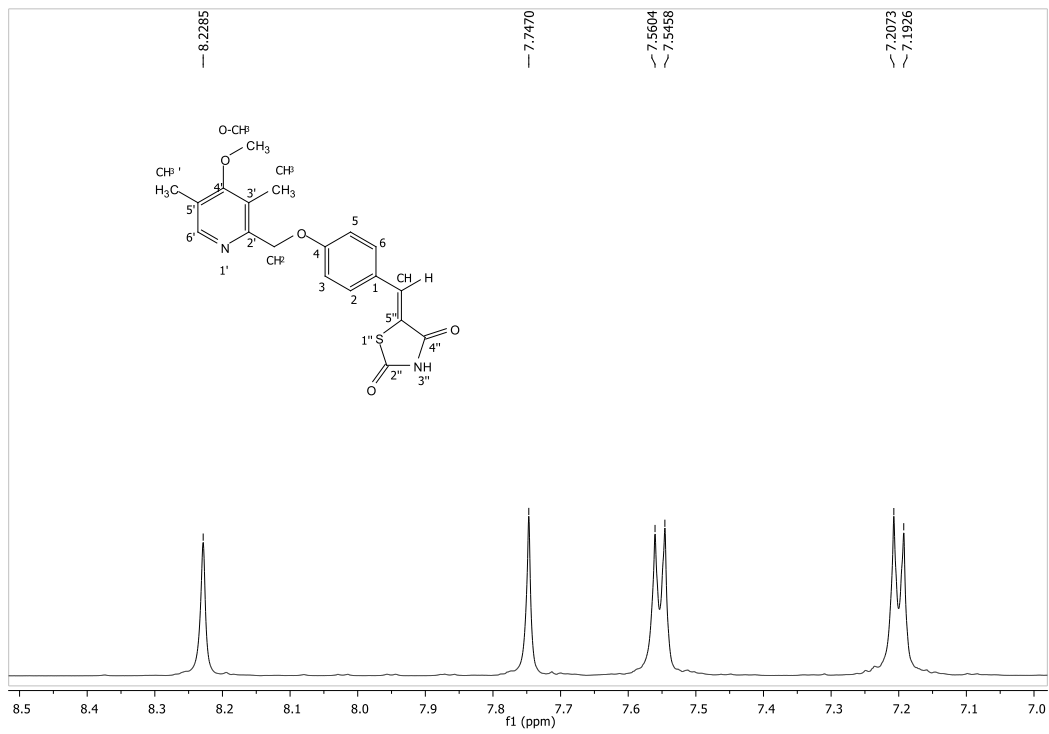
ACB-5 #248 RT: 8.36 AV: 1 NL: 1.47E7
T: + c Full ms [50.00-650.00]



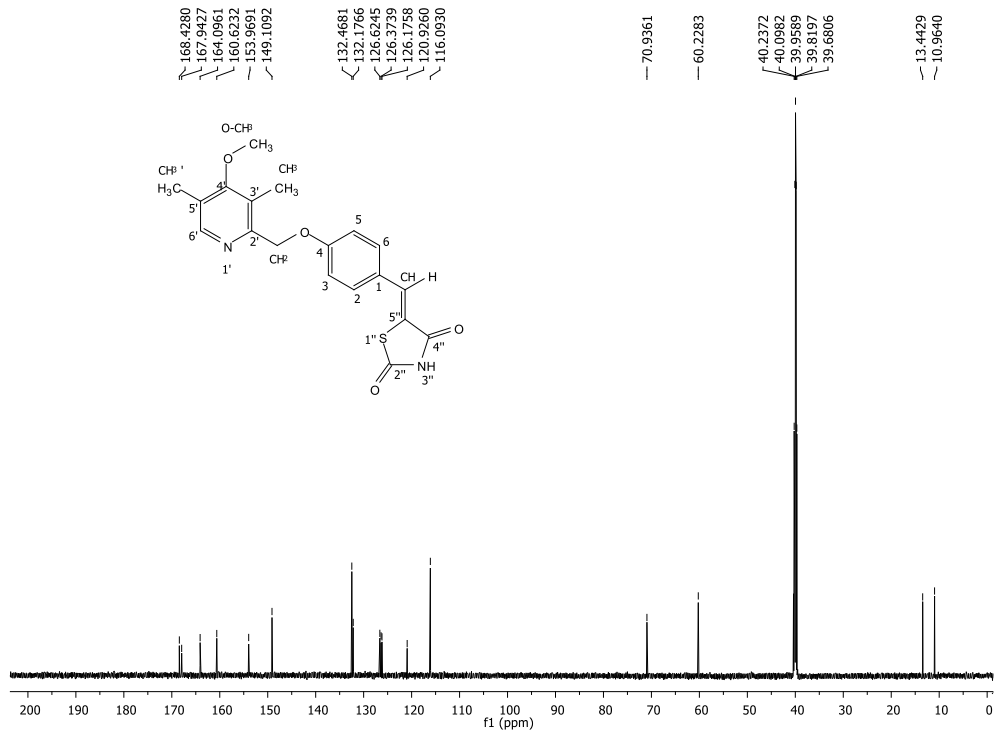
Espectro 25. Patrón de fragmentación del compuesto ACB-5 modalidad IE



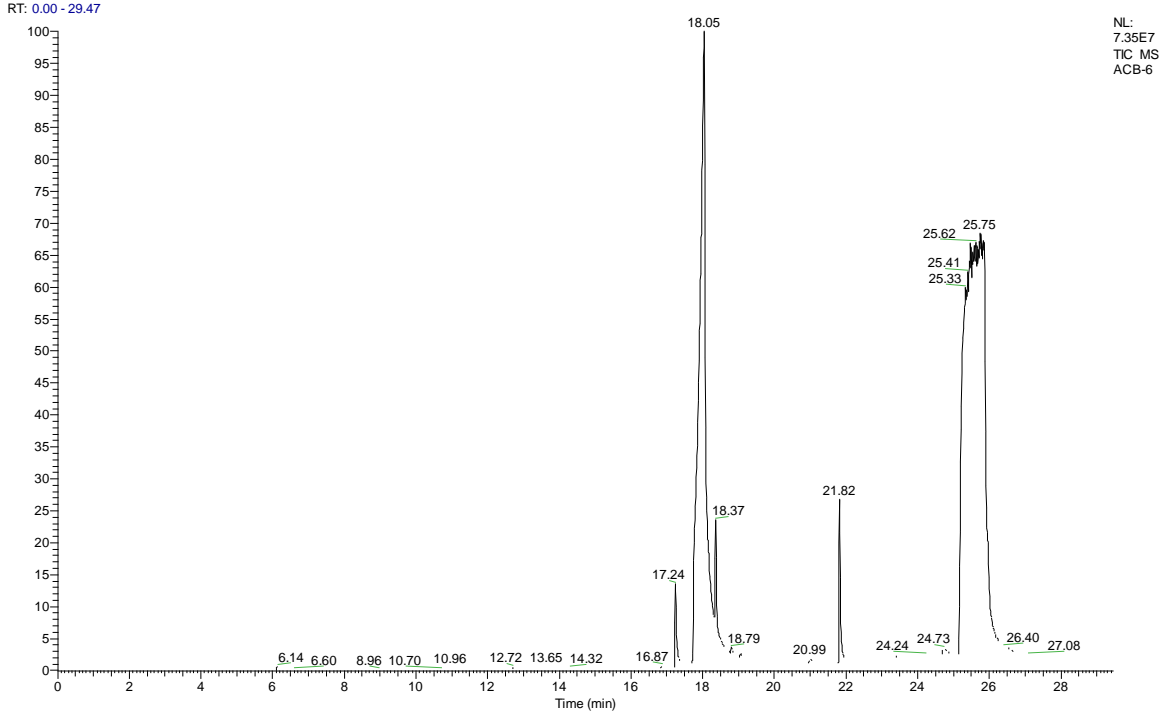
Espectro 26. Espectro RMN ¹H del compuesto ACB-5



Espectro 27. Expansión RMN ¹H del compuesto ACB-5

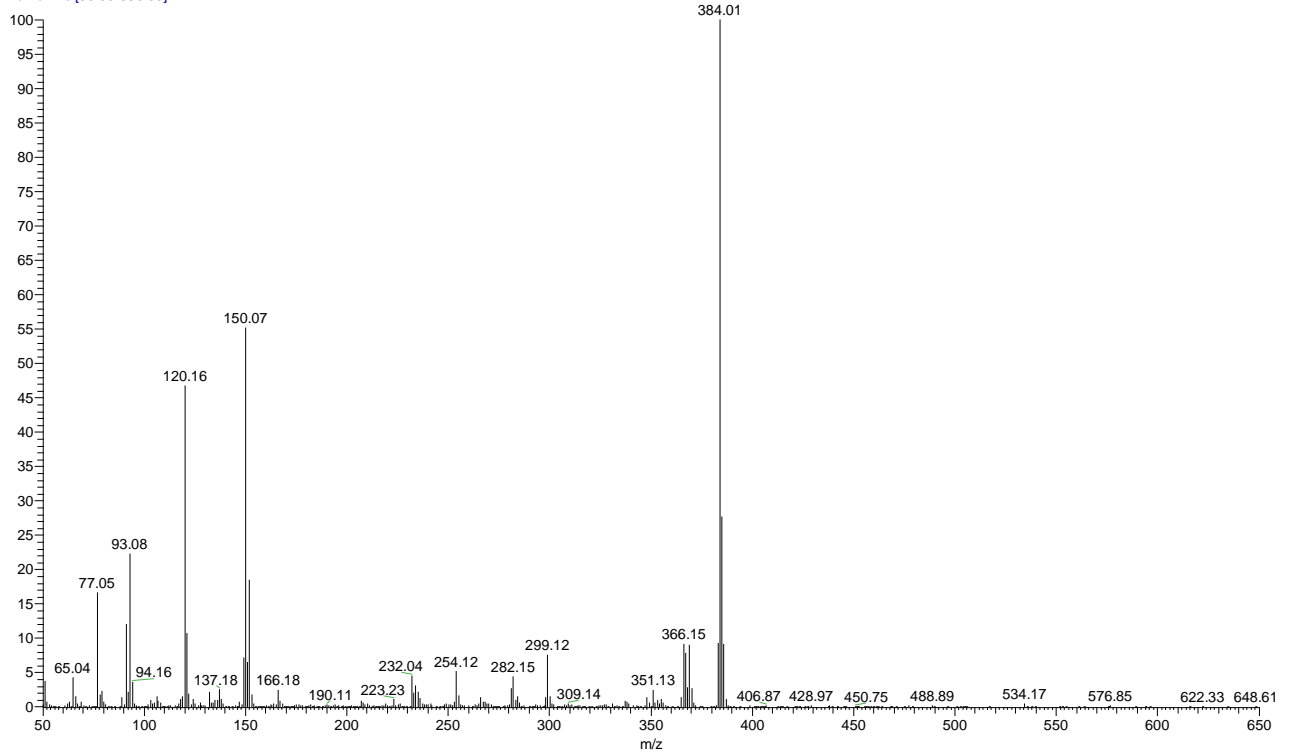


Espectro 28. Espectro RMN ¹³C del compuesto ACB-5

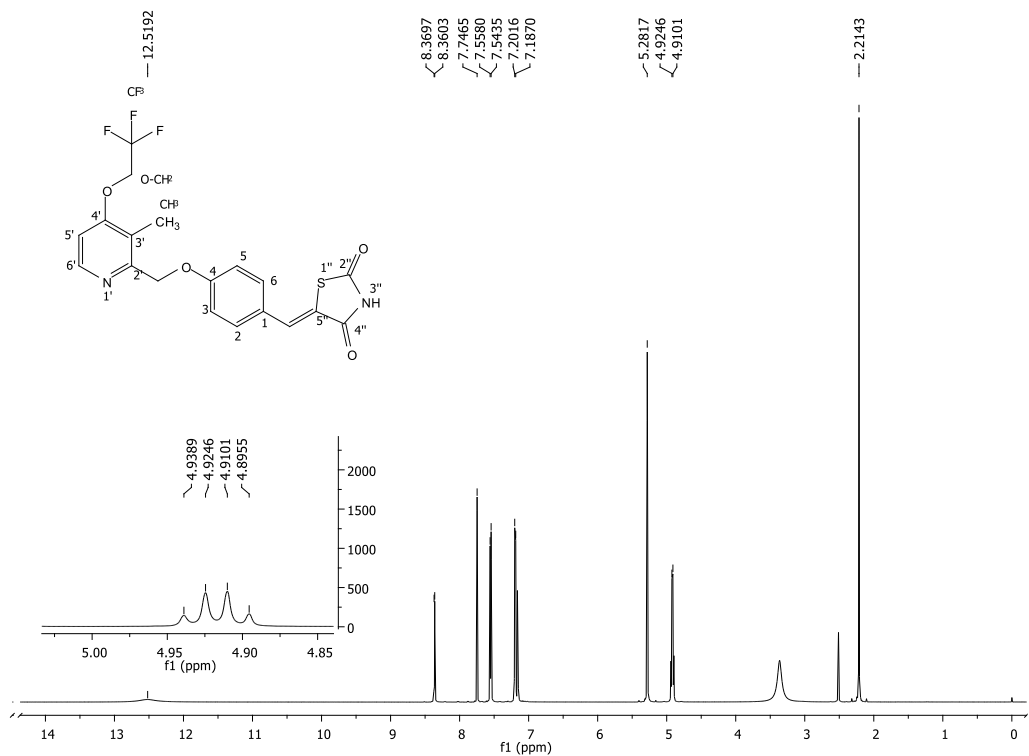


Espectro 29. Cromatograma del compuesto ACB-6

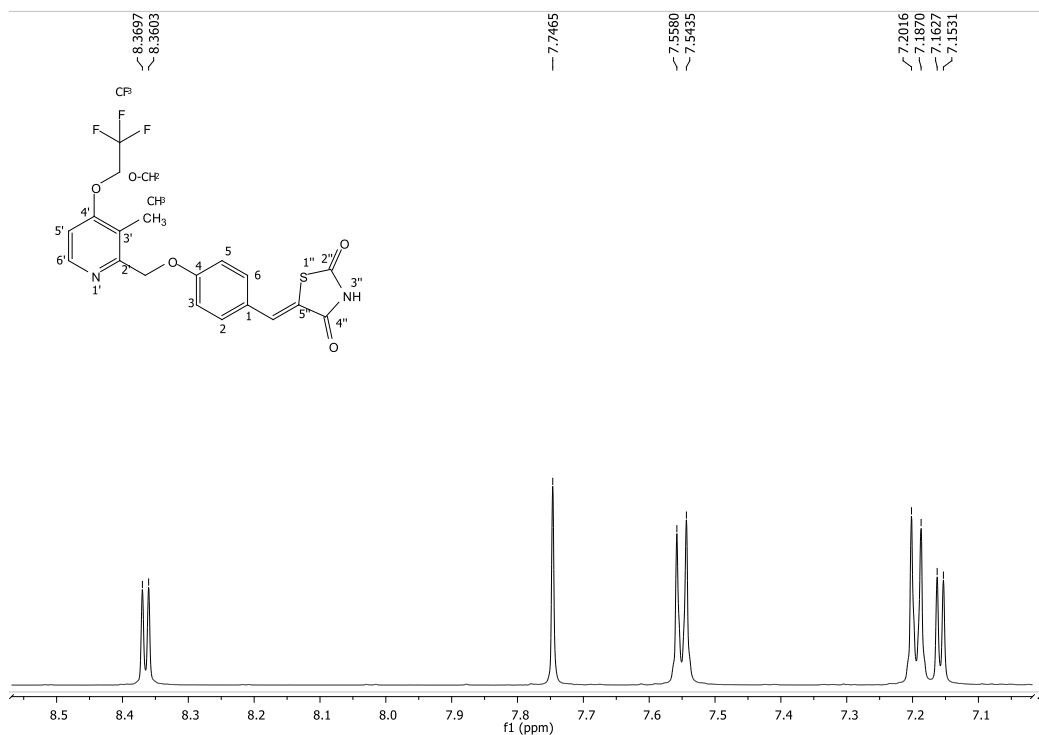
ACB-6 #2089 RT: 25.66 AV: 1 NL: 9.34E6
T: + c Full ms [50.00-650.00]



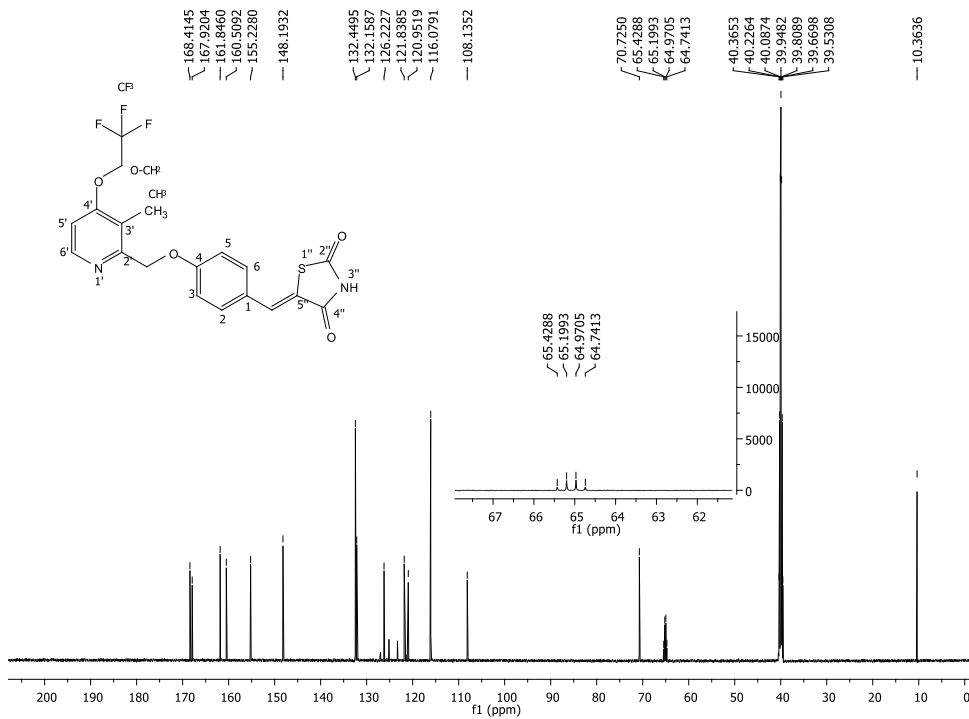
Espectro 30. Patrón de fragmentación del compuesto ACB-6



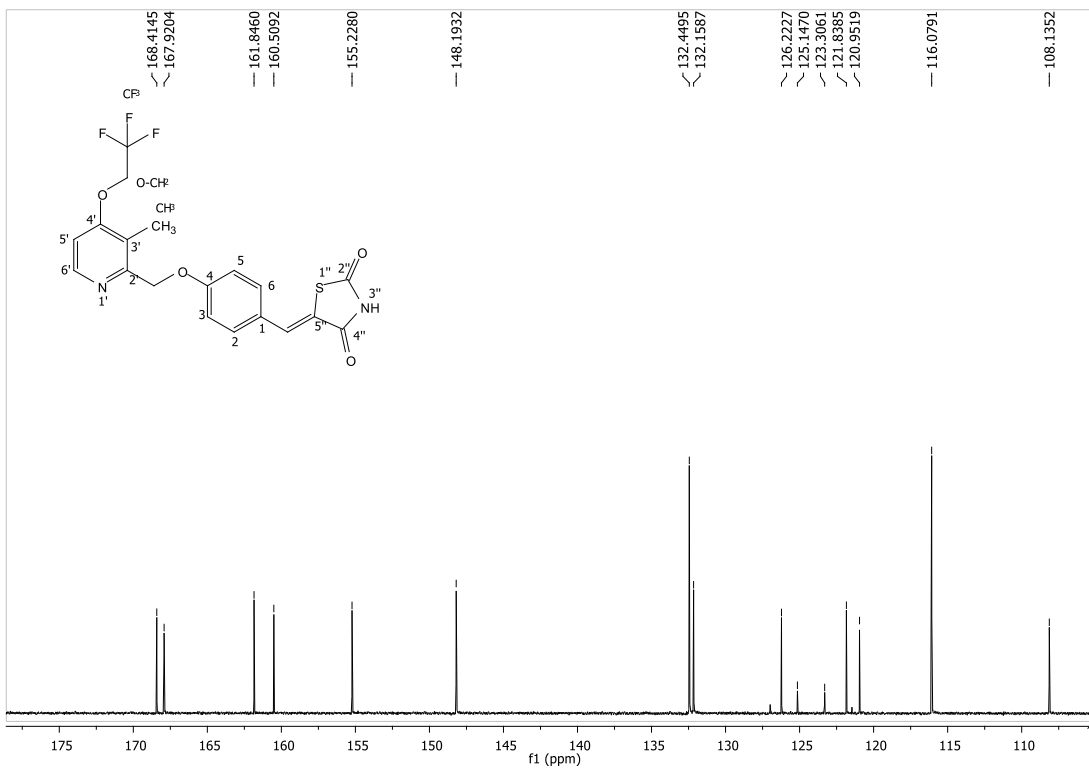
Espectro 31. Espectro RMN ¹H del compuesto ACB-6



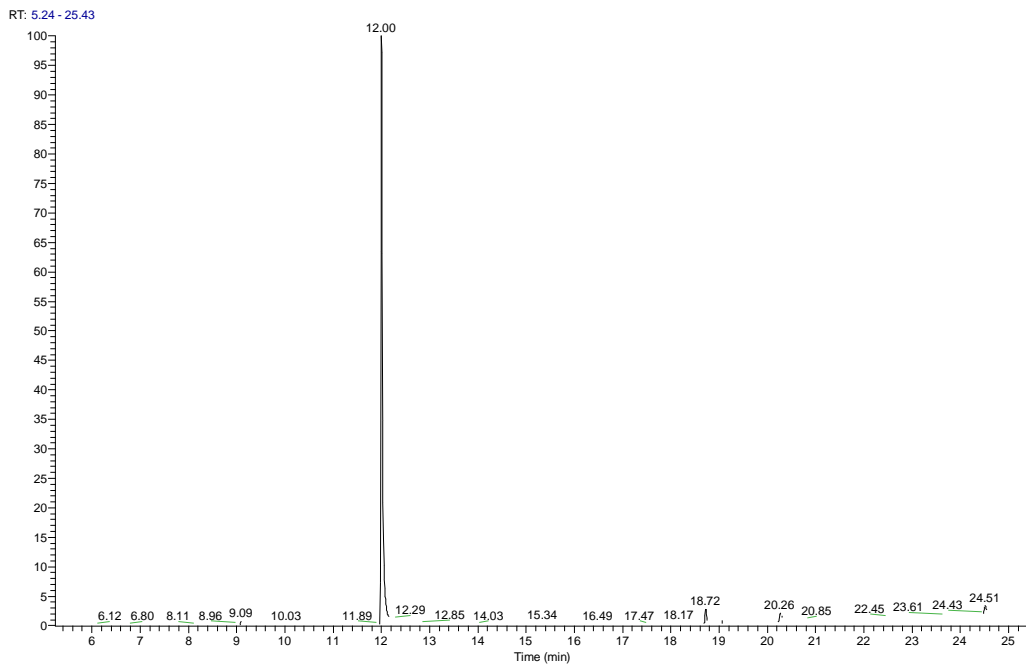
Espectro 32. Expansión de la zona aromática del espectro RMN ¹H del compuesto ACB-6



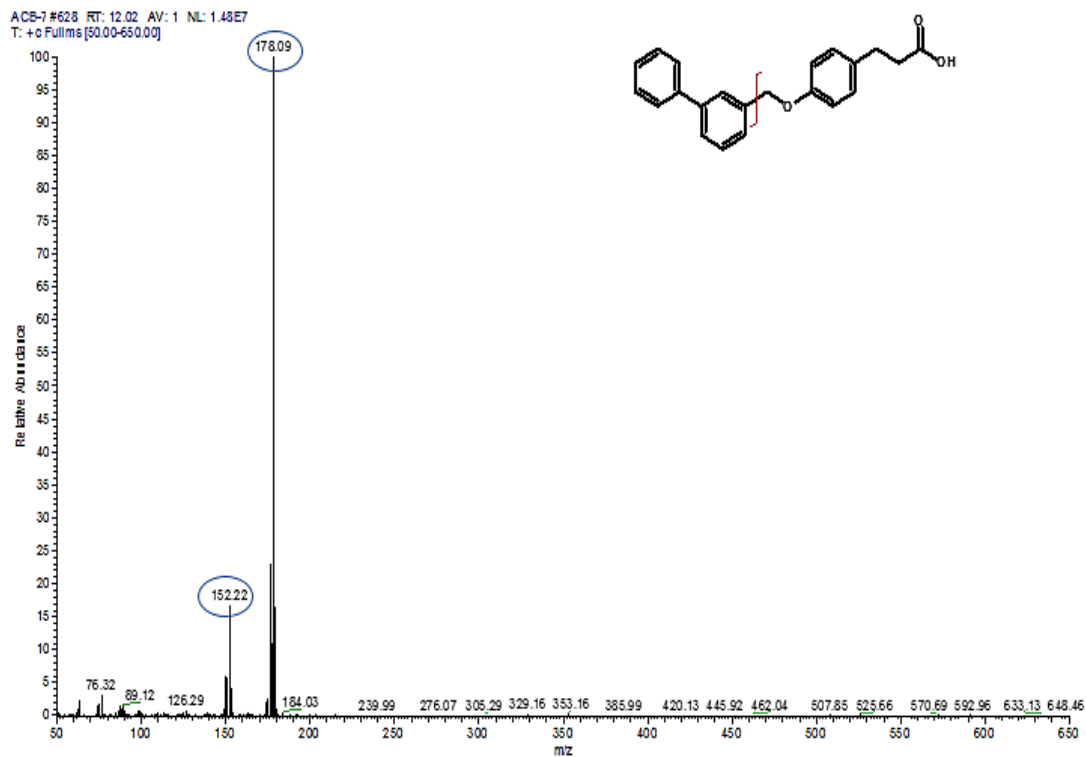
Espectro 33. Espectro RMN ¹³C del compuesto ACB-6



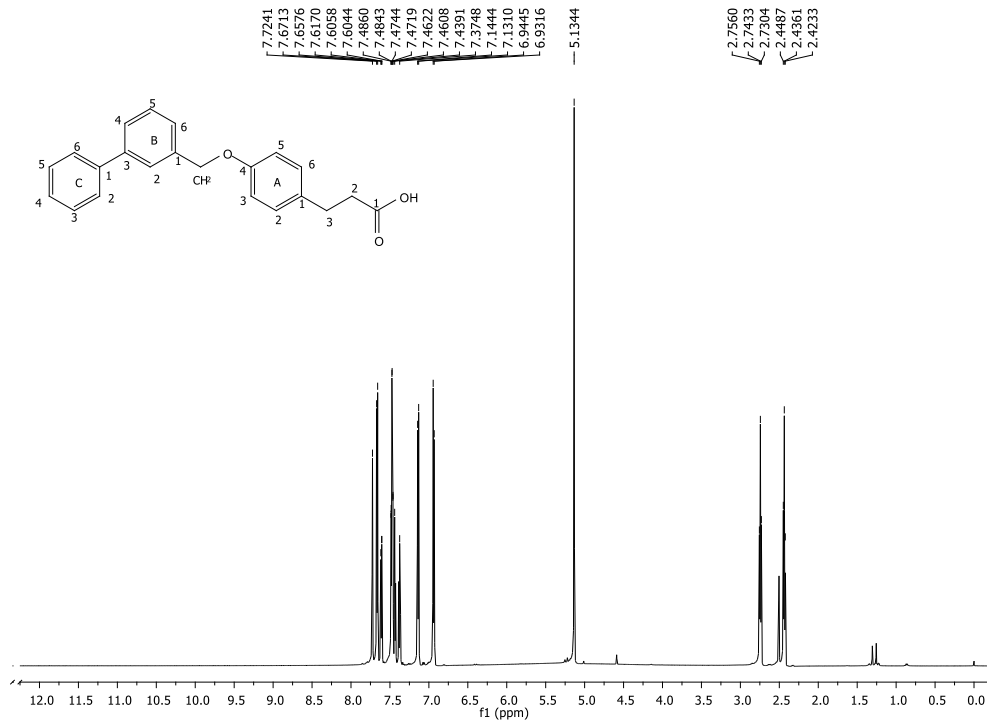
Espectro 34. Espectro RMN ¹³C del compuesto ACB-6



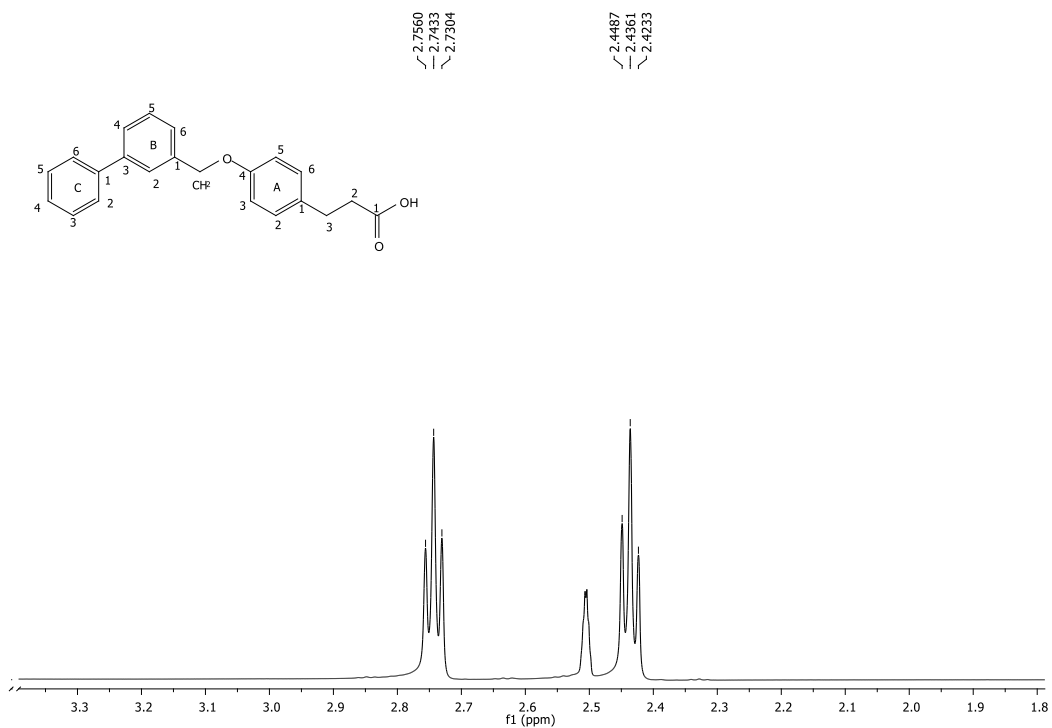
Espectro 35. Cromatograma del compuesto ACB-7



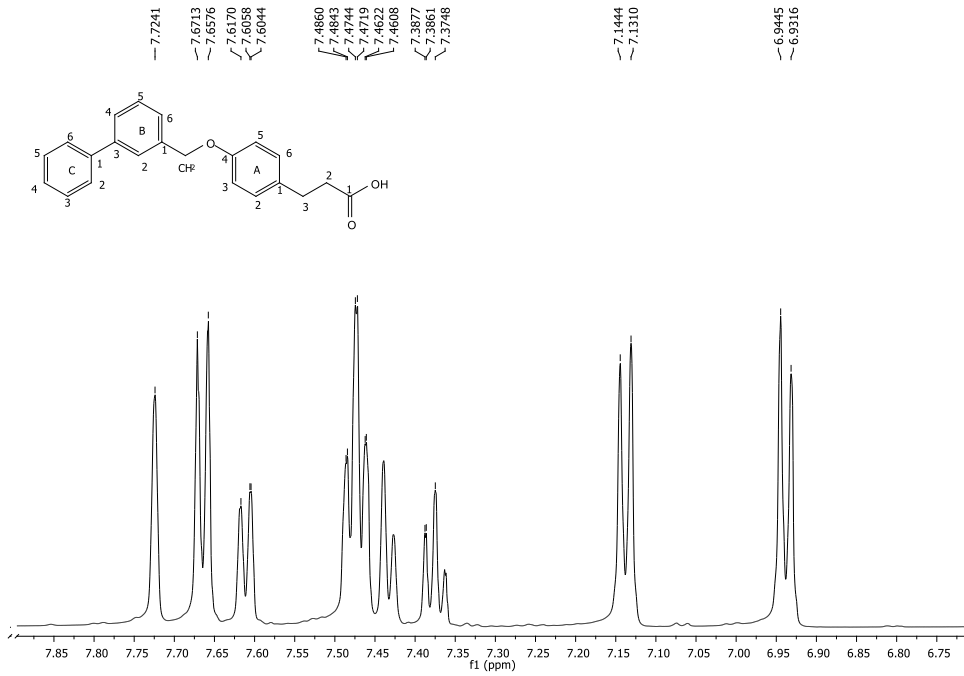
Espectro 36. Espectro de masas IE del compuesto ACB-7



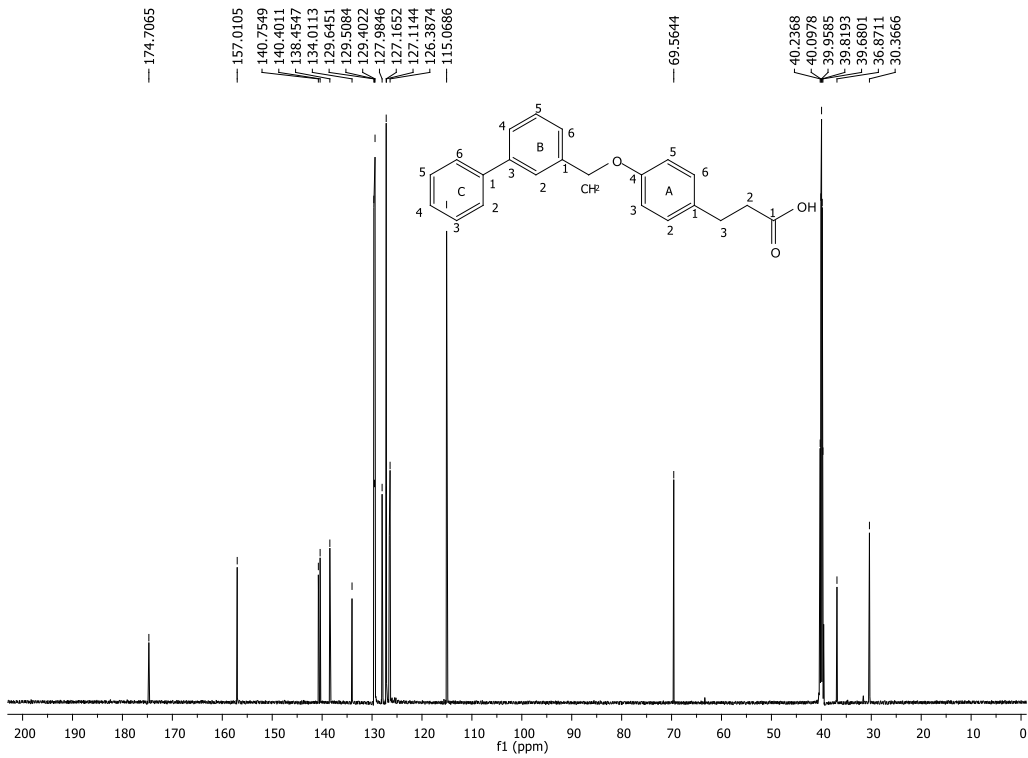
Espectro 37. Espectro RMN ¹H del compuesto ACB-7



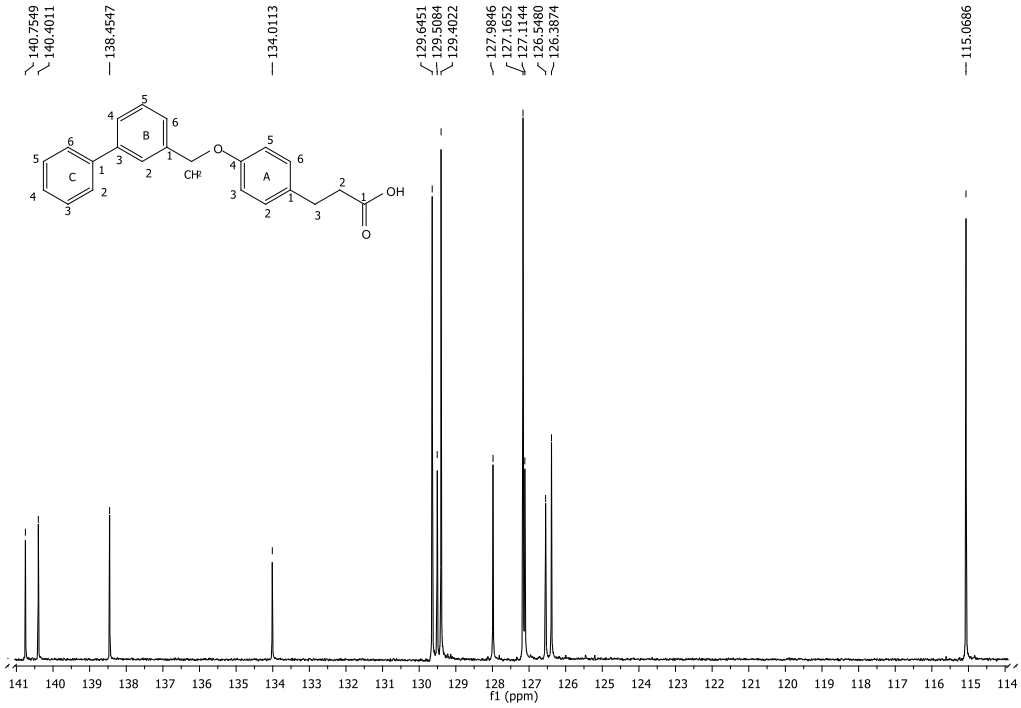
Espectro 38. Expansión de la zona alifática RMN ¹H del compuesto ACB-7



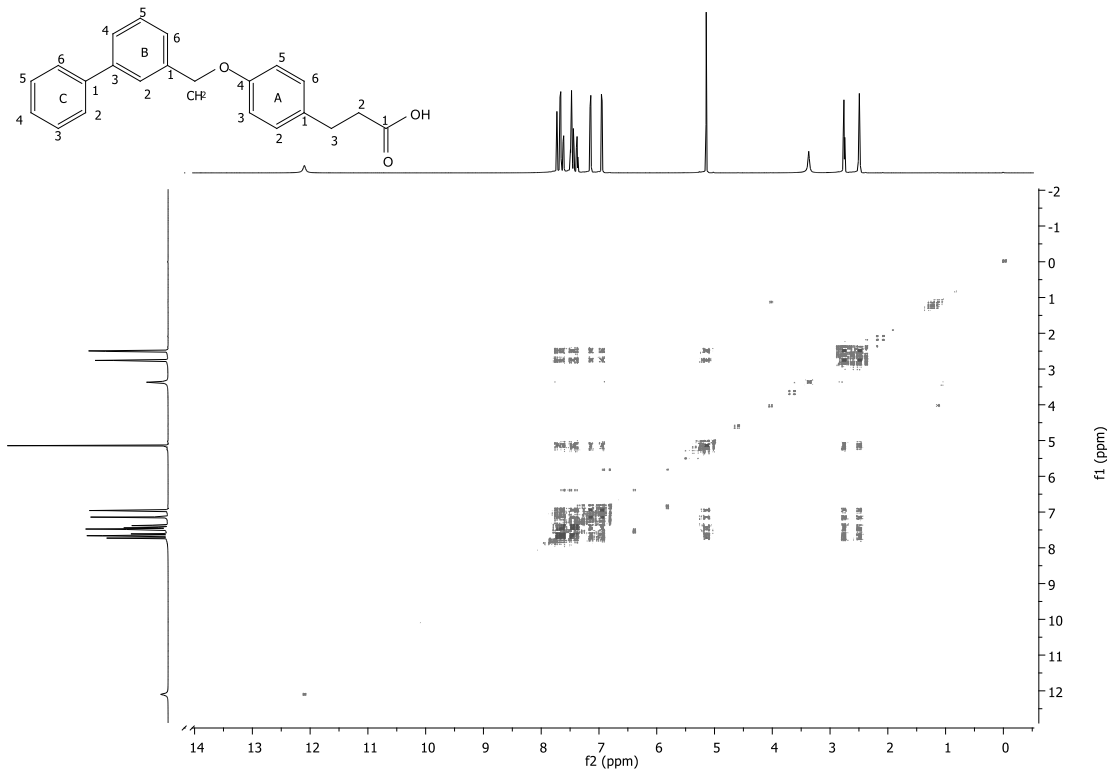
Espectro 39. Expansión de la zona aromática RMN ¹H del compuesto ACB-7.



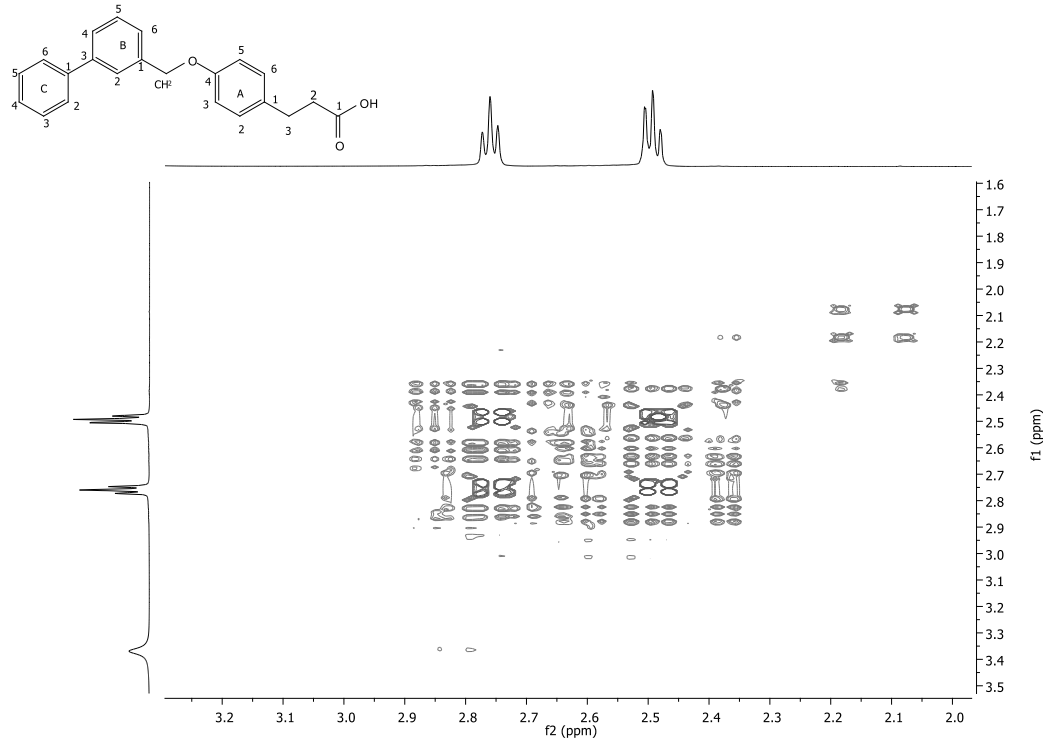
Espectro 40. Espectro RMN ¹³C del compuesto ACB-7.



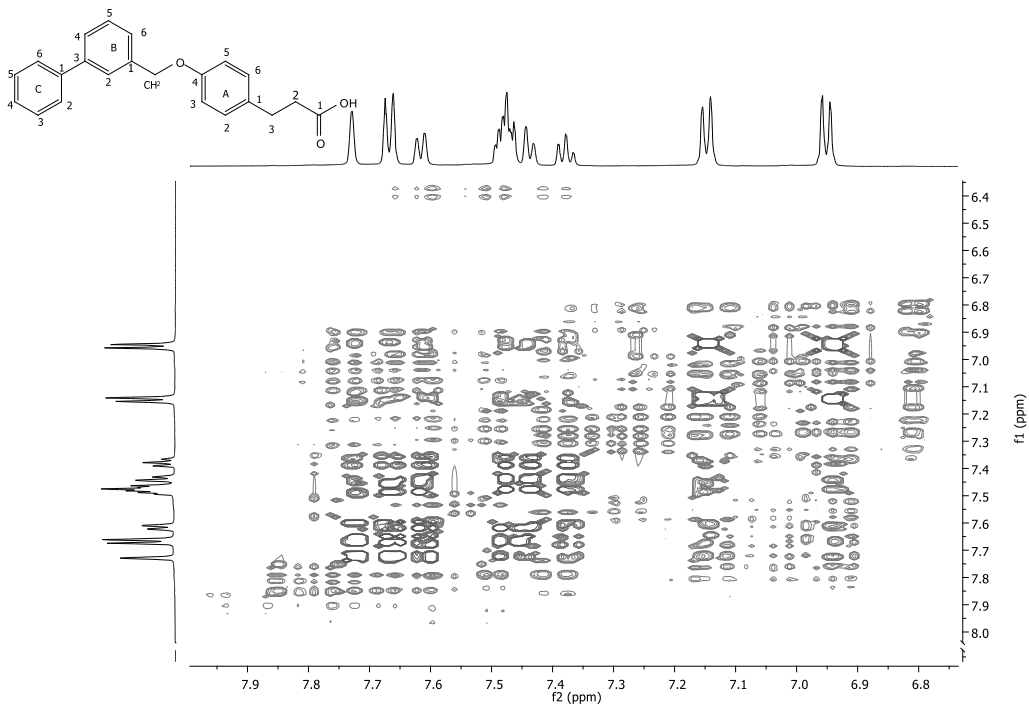
Espectro 41. Expansión RMN ¹³C del compuesto ACB-7.



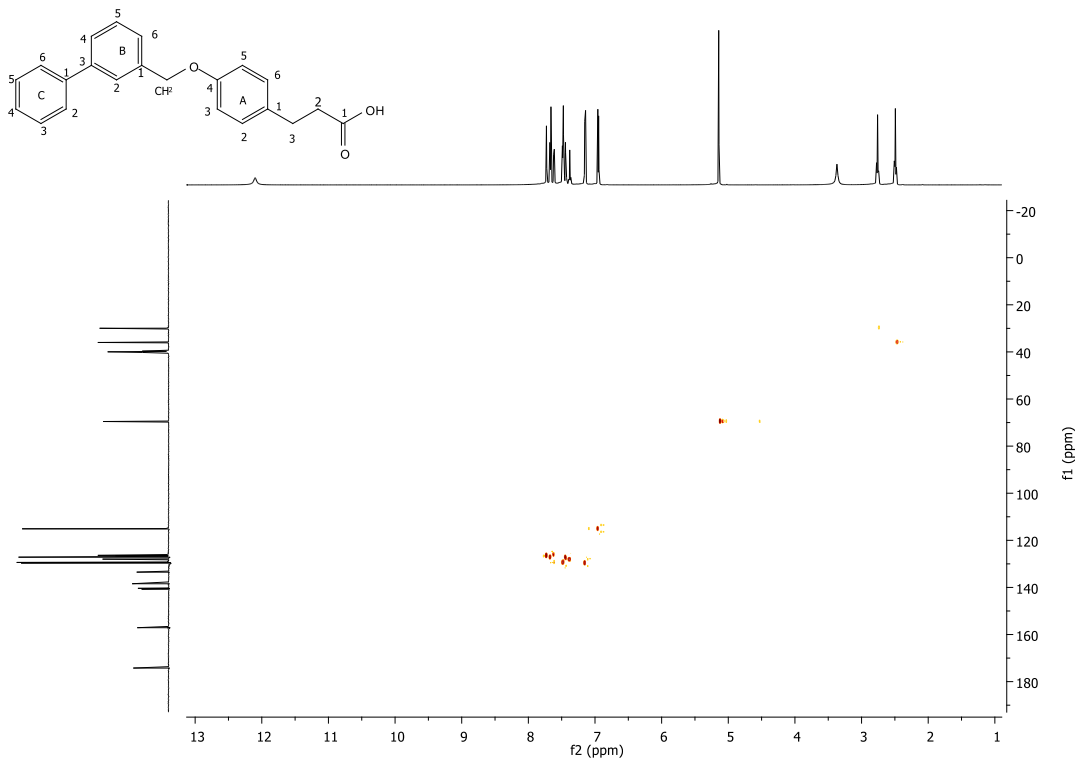
Espectro 42. Espectro COSY del compuesto ACB-7.



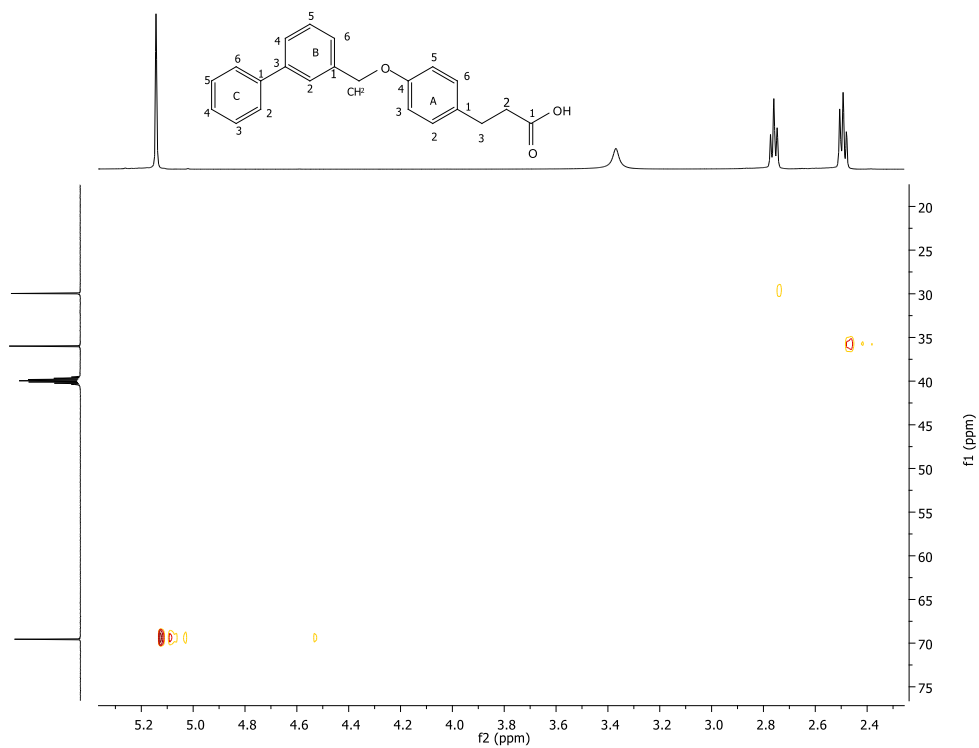
Espectro 43. Expansión zona alifática COSY del compuesto ACB-7.



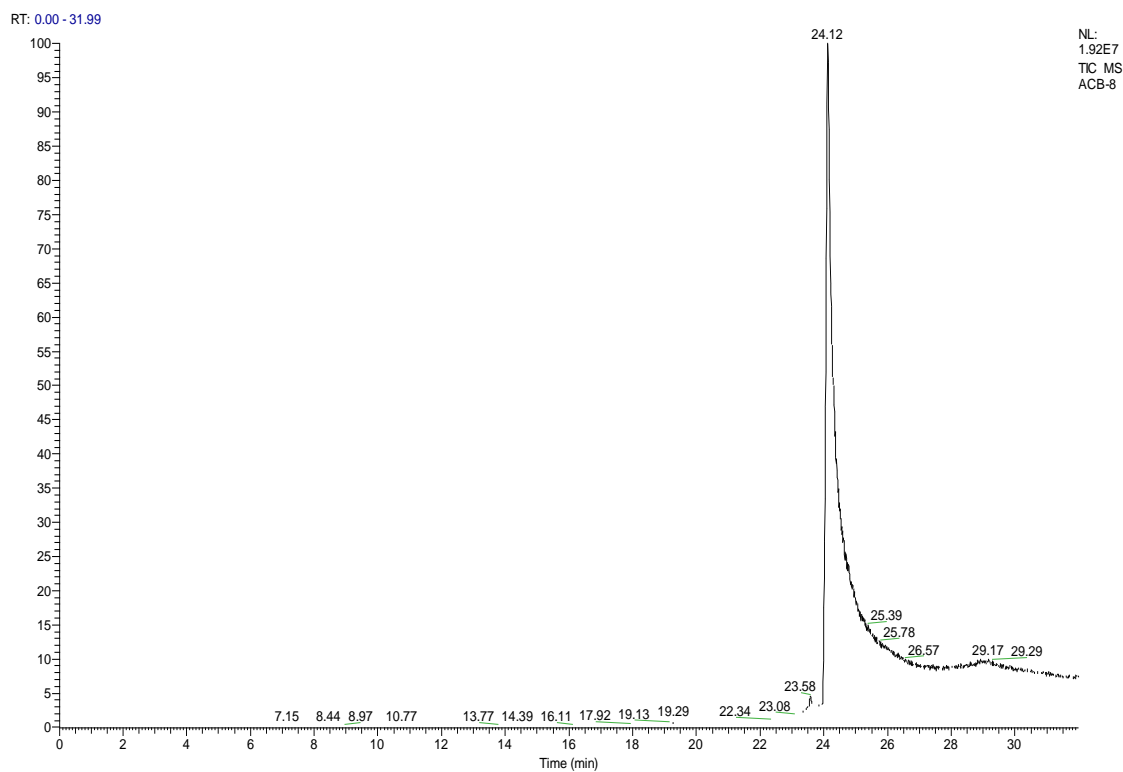
Espectro 44. Expansión zona aromática COSY del compuesto ACB-7.



Espectro 45. Espectro HSQC del compuesto ACB-7.

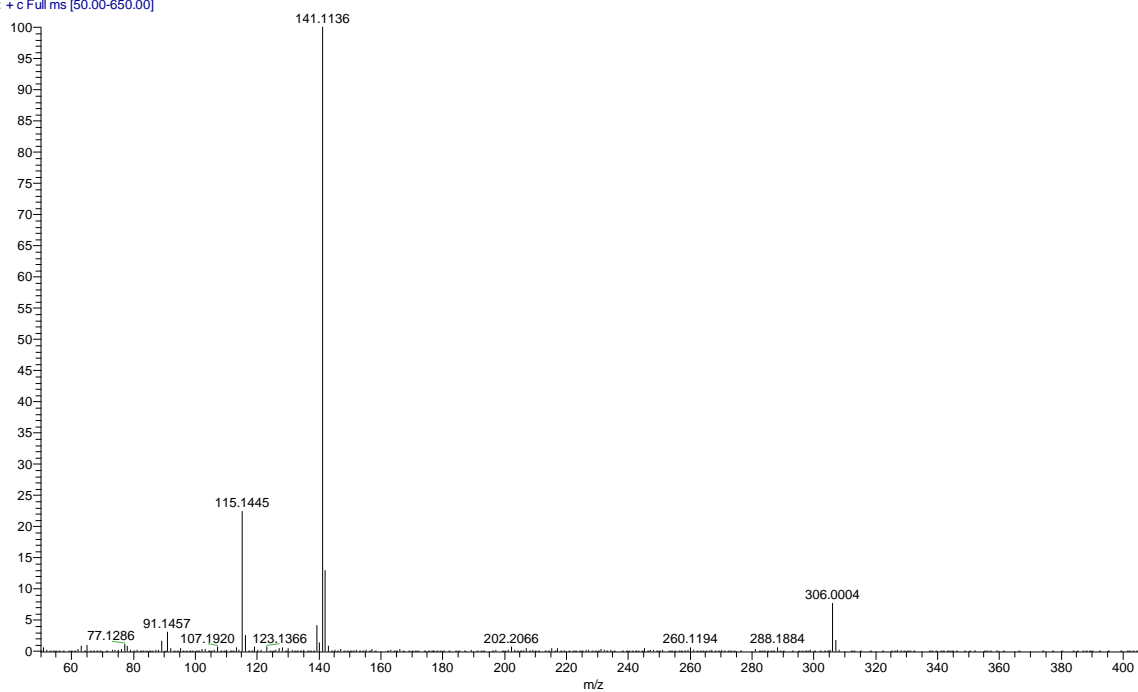


Espectro 46. Expansión zona alifática HSQC del compuesto ACB-7.

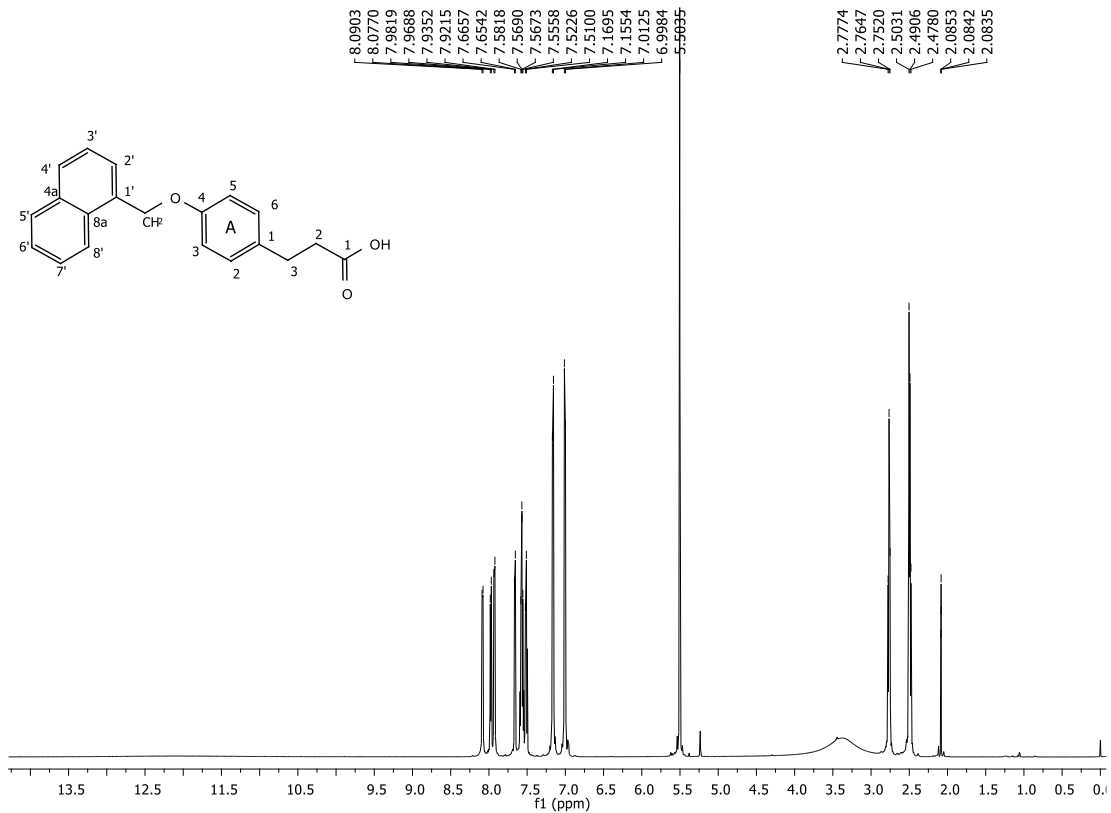


Espectro 47. Cromatograma del compuesto **ACB-8**

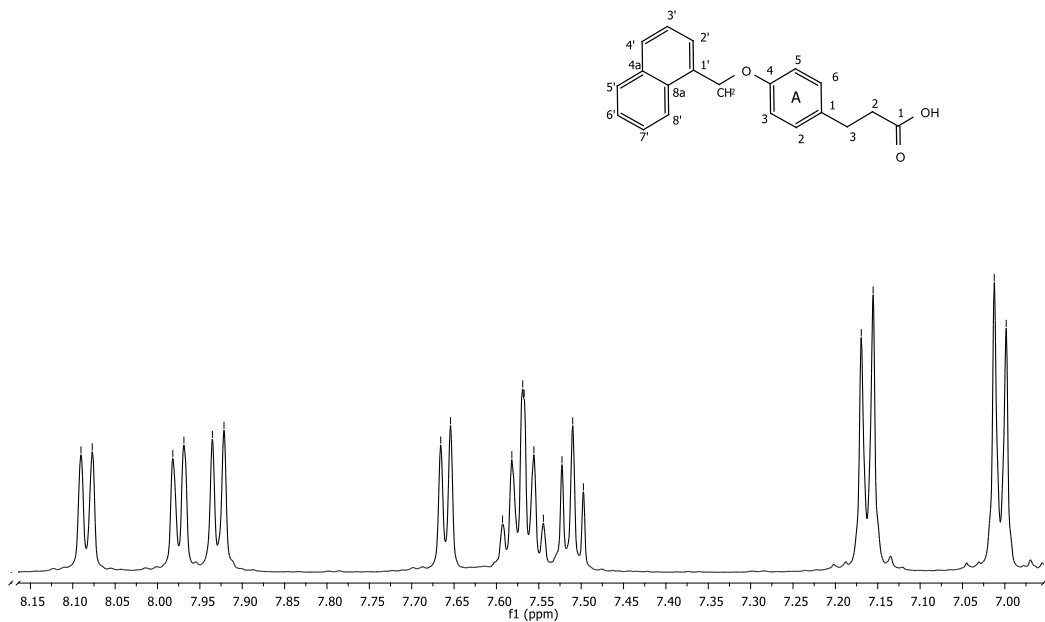
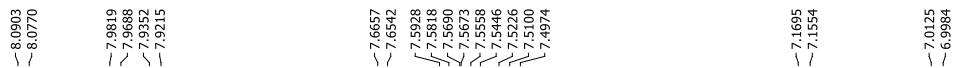
ACB-8 #1741 RT: 24.24 AV: 1 NL: 5.66E6
T: + c Full ms [50.00-650.00]



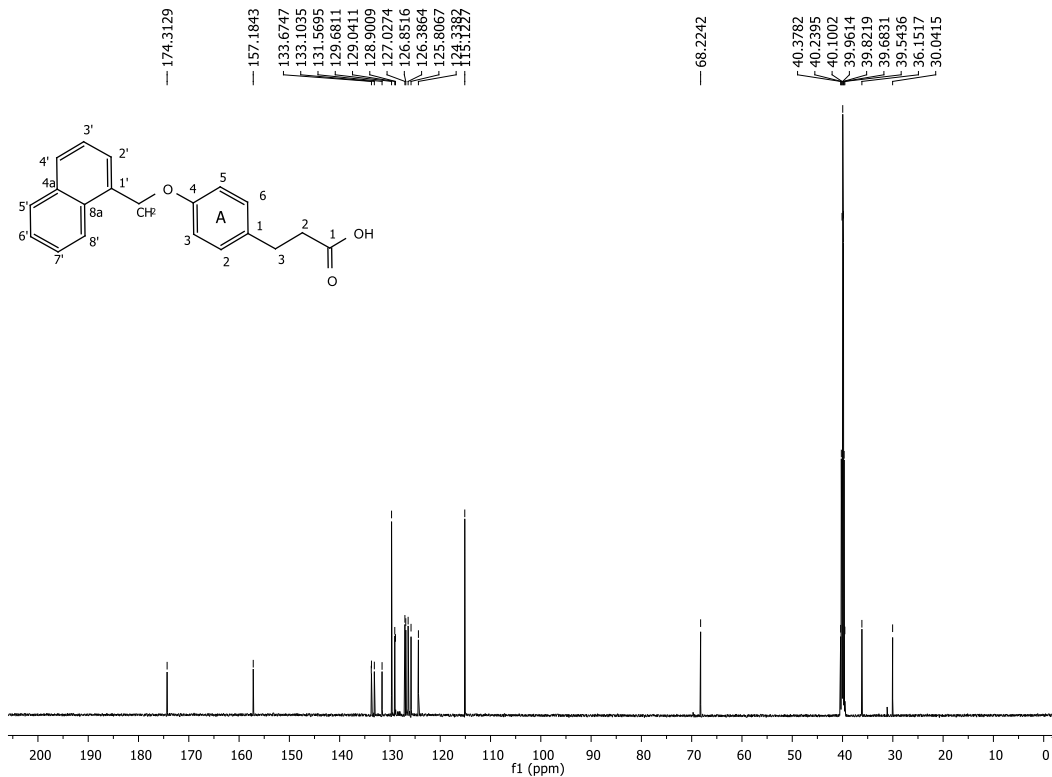
Espectro 48. Espectro IE del compuesto **ACB-8**



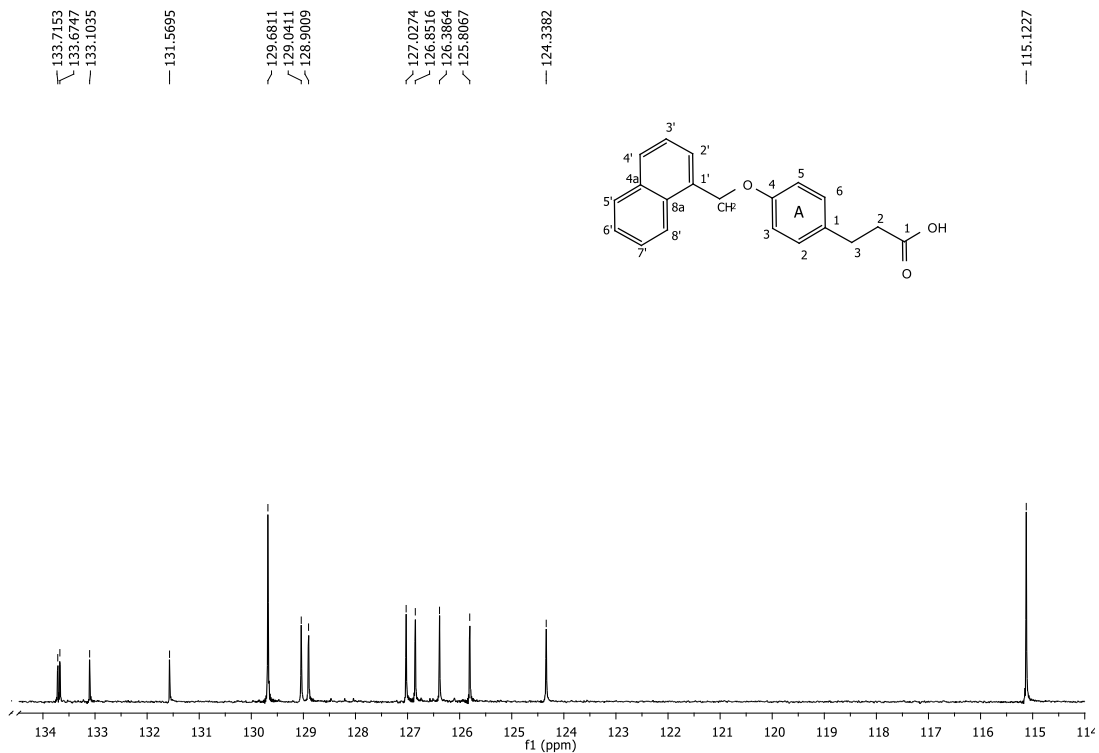
Espectro 49. Espectro RMN ¹H compuesto ACB-8.



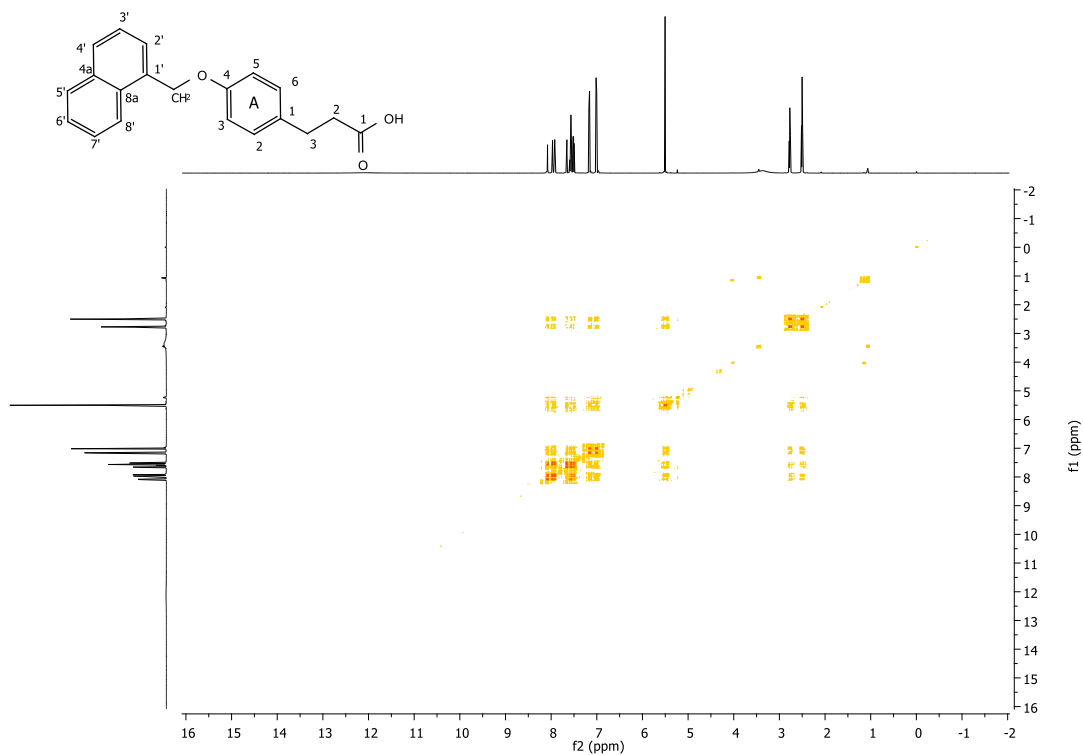
Espectro 50. Expansión zona aromática RMN ¹H compuesto ACB-8.



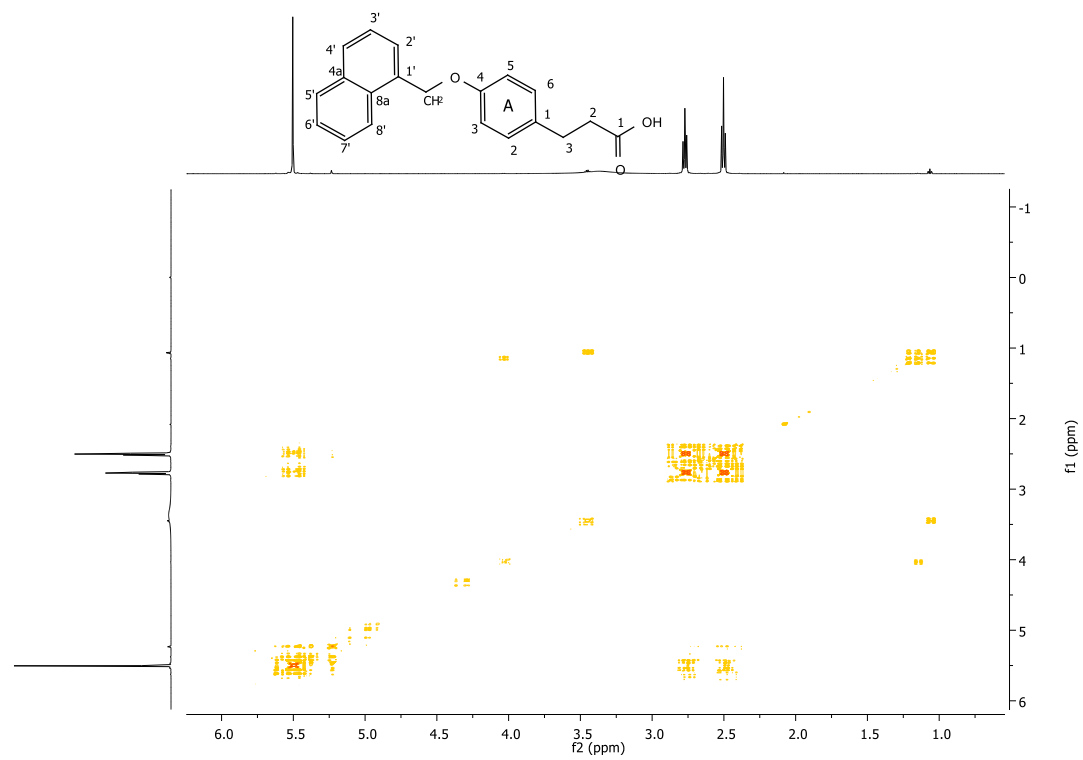
Espectro 51. Espectro RMN ¹³C compuesto ACB-8.



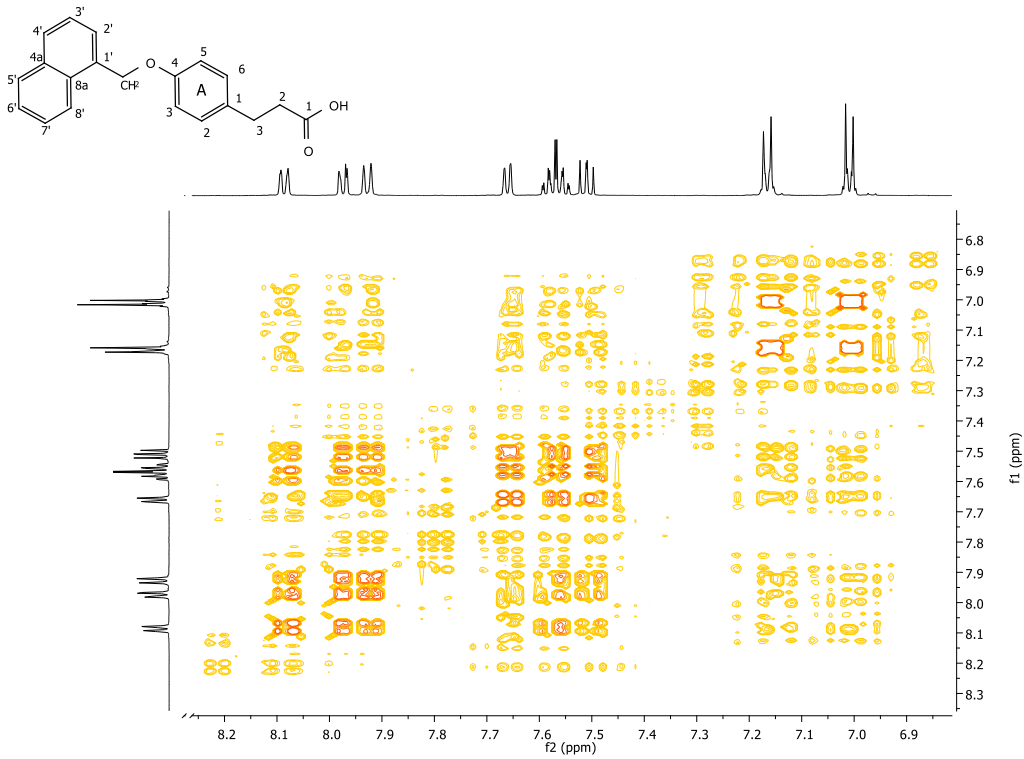
Espectro 52. Expansión zona aromática RMN ¹³C compuesto ACB-8.



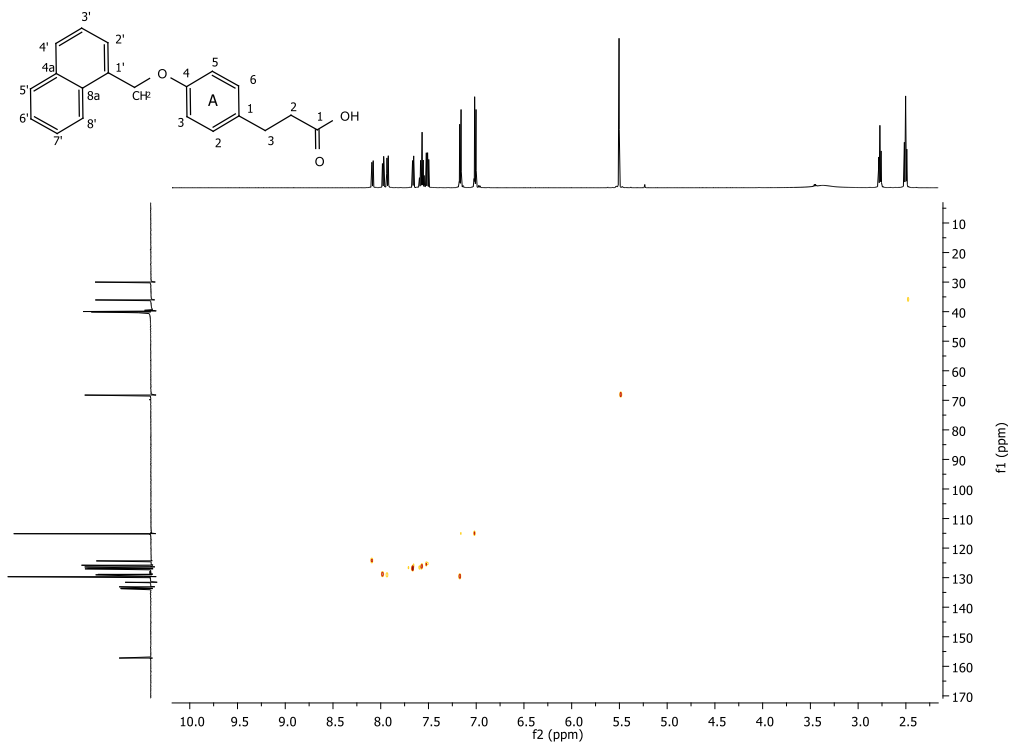
Espectro 53. Espectro COSY compuesto ACB-8.



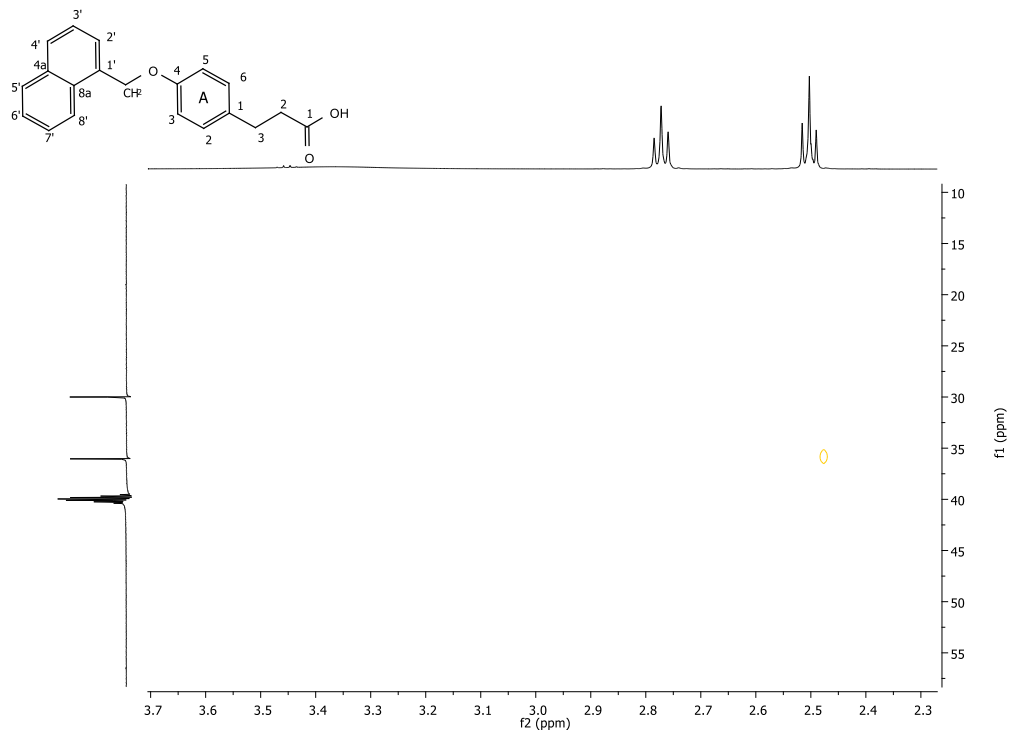
Espectro 54. Expansión zona alifática COSY compuesto ACB-8.



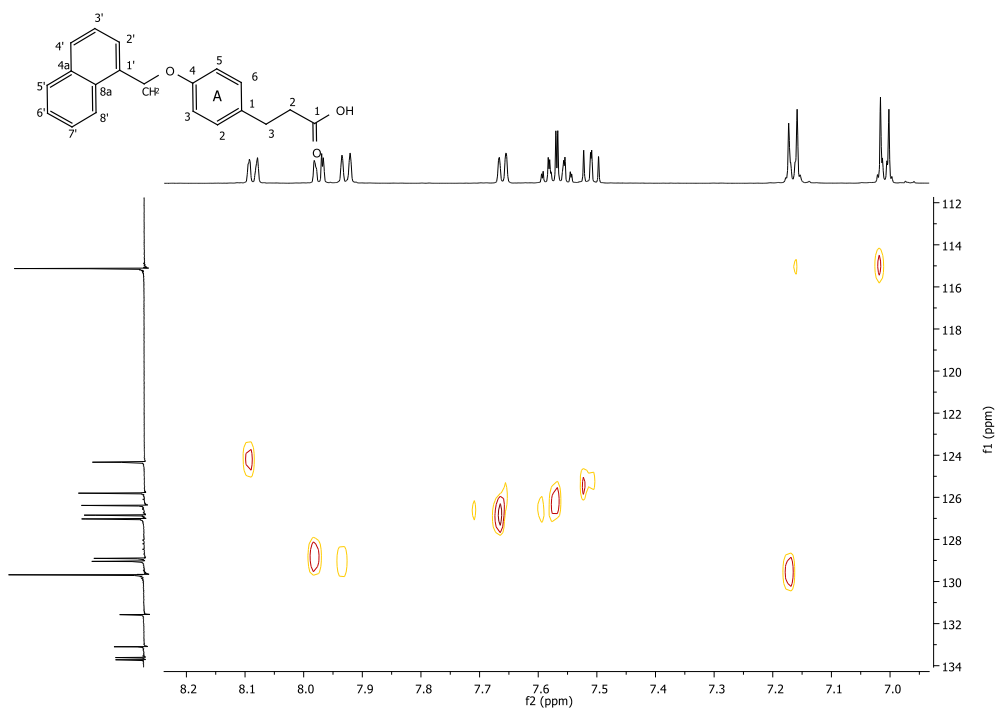
Espectro 55. Expansión zona aromática COSY compuesto ACB-8



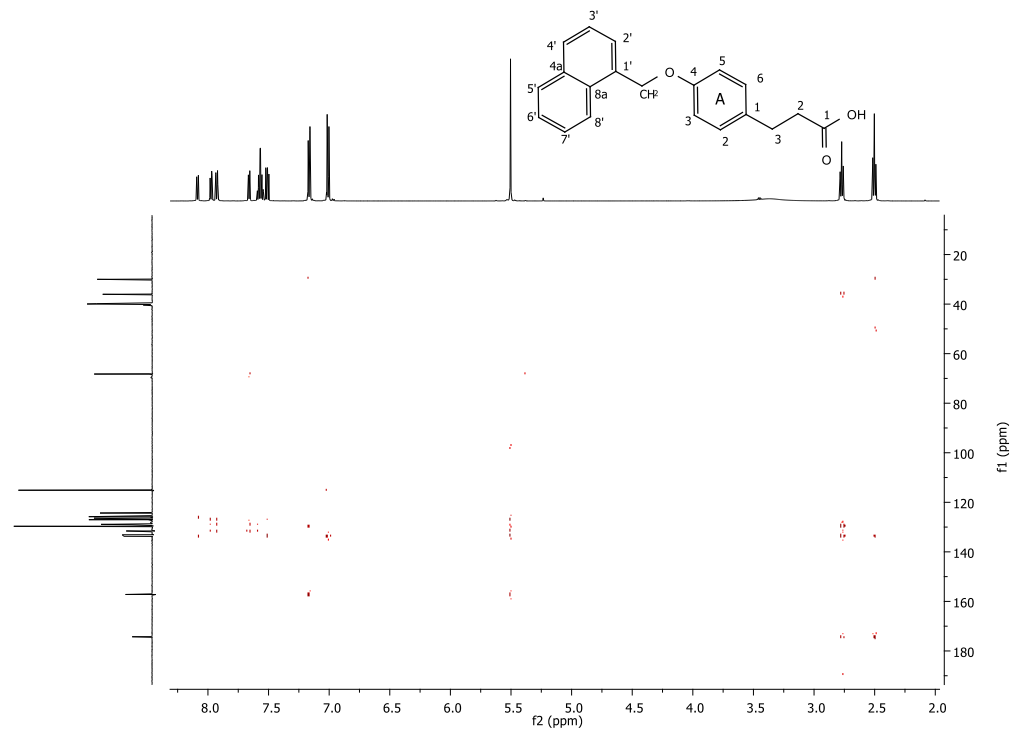
Espectro 56. Espectro HSQC compuesto ACB-8.



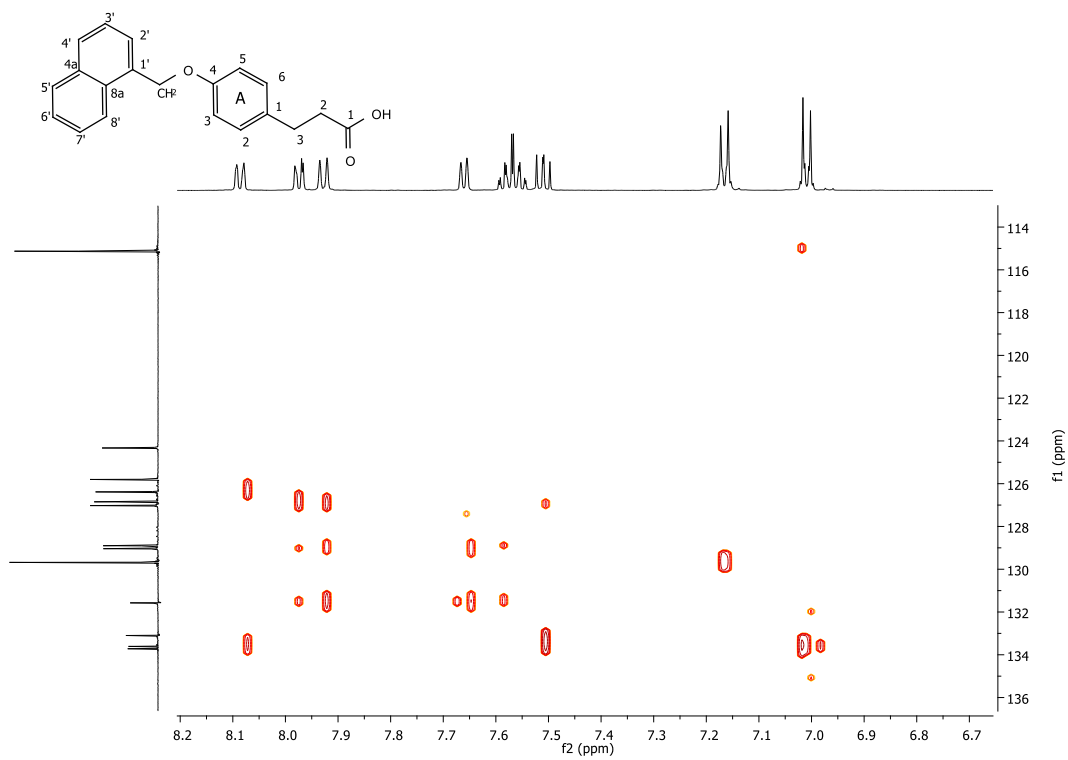
Spectro 57. Expansión zona alifática HSQC compuesto ACB-8.



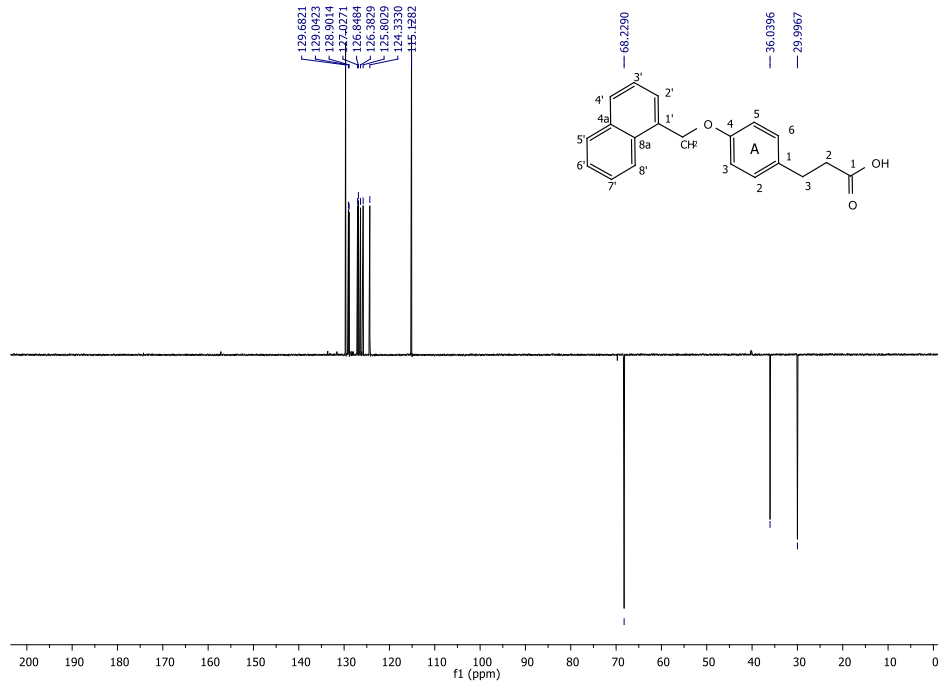
Spectro 58. Expansión zona aromática HSQC compuesto ACB-8.



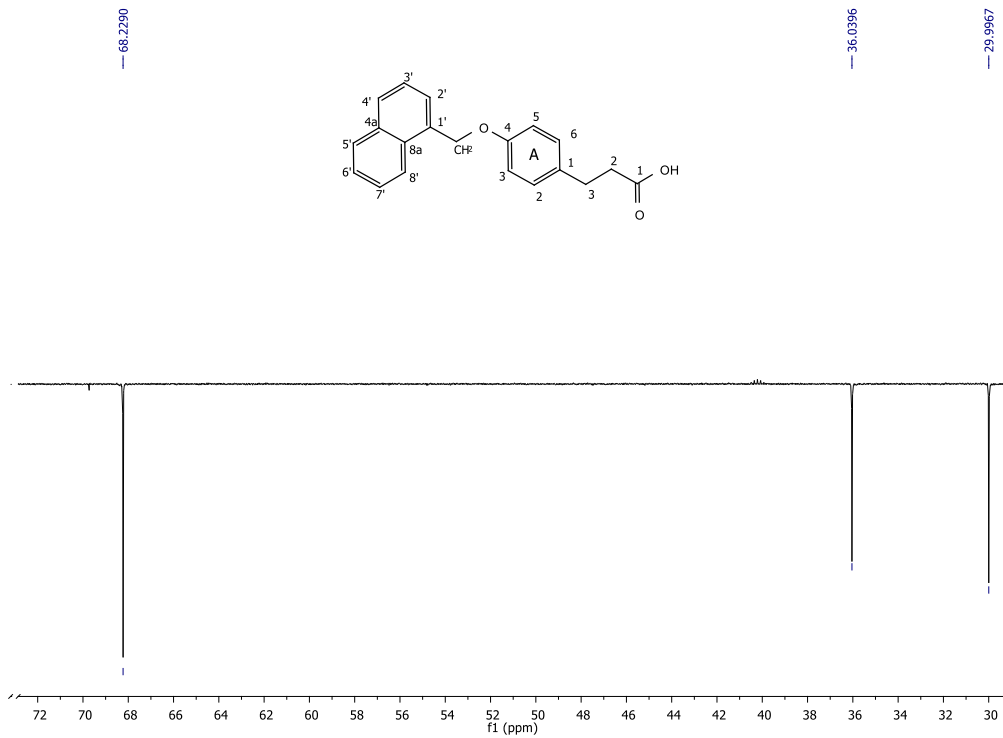
Espectro 59. Espectro HMBC compuesto ACB-8.



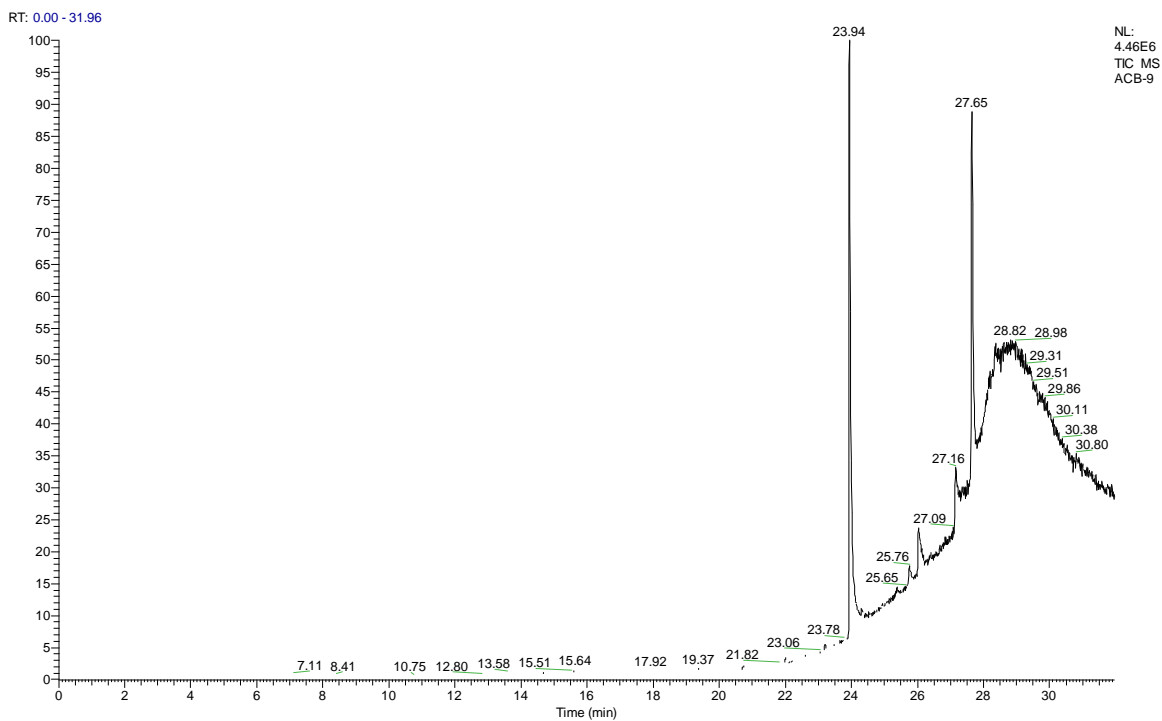
Espectro 60. Expansión HMBC compuesto ACB-8.



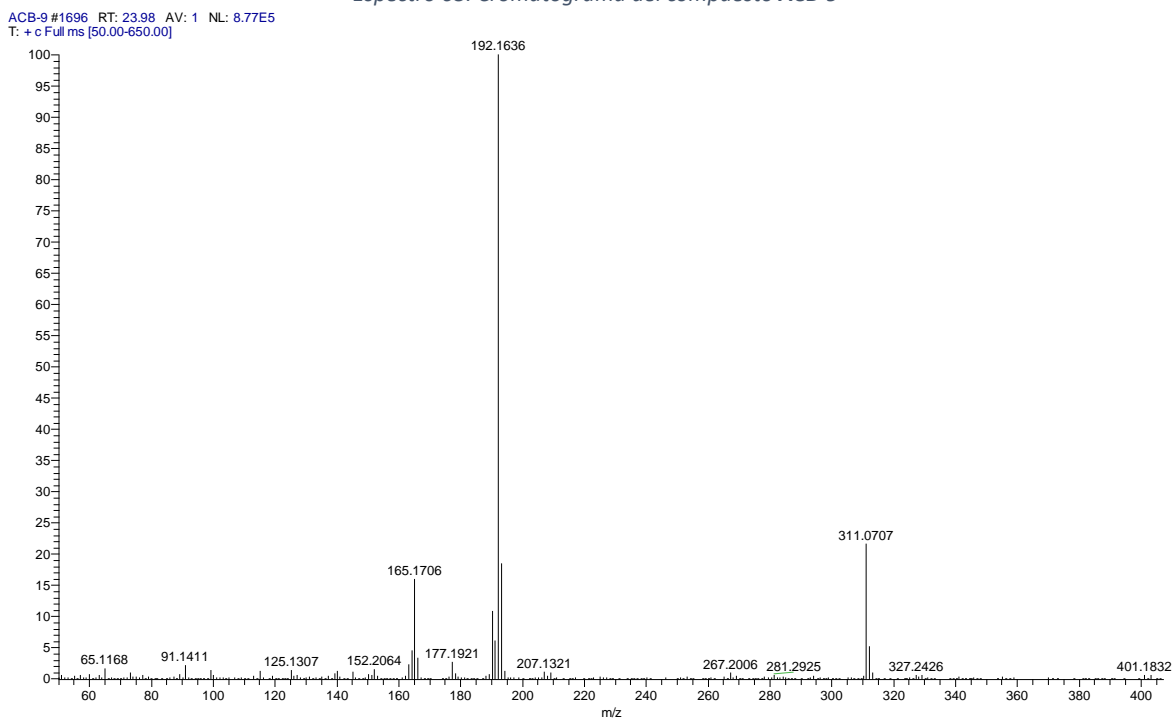
Espectro 61. Espectro DEPT compuesto ACB-8.



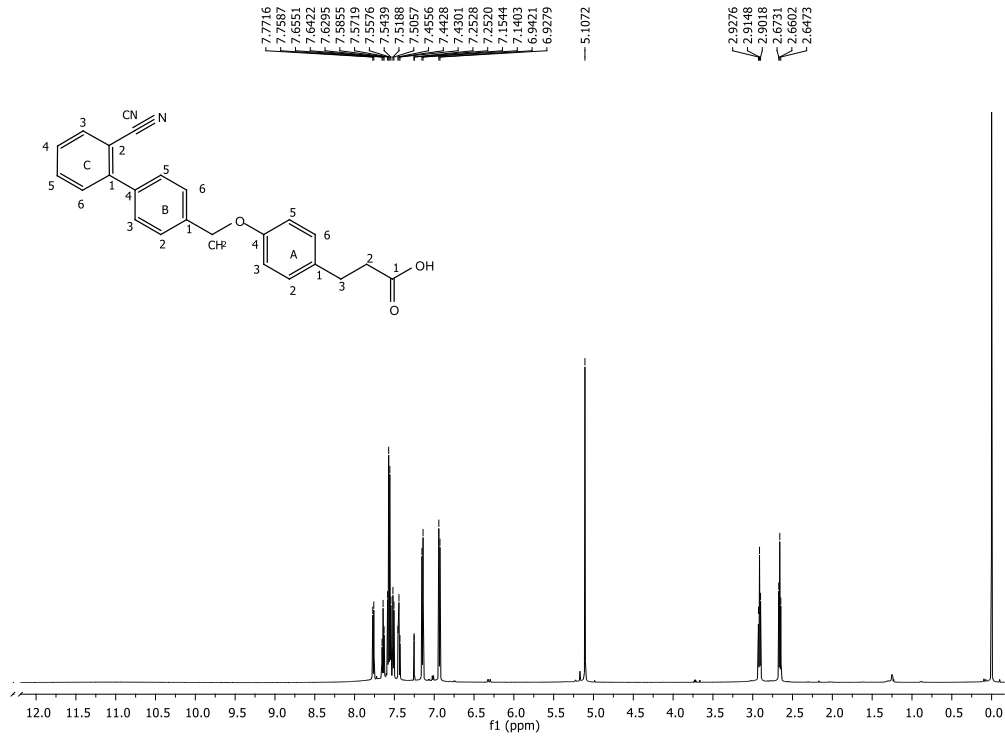
Espectro 62. Espectro DEPT zona alifática compuesto ACB-8.



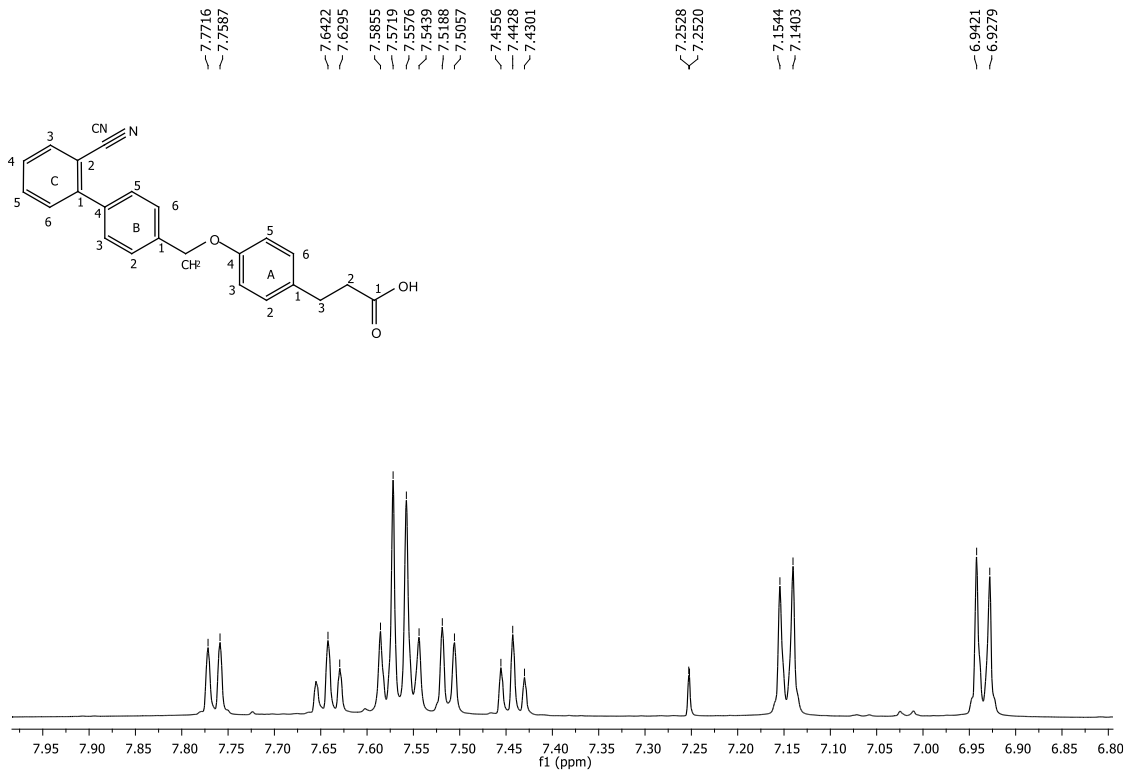
Espectro 63. Cromatograma del compuesto ACB-9



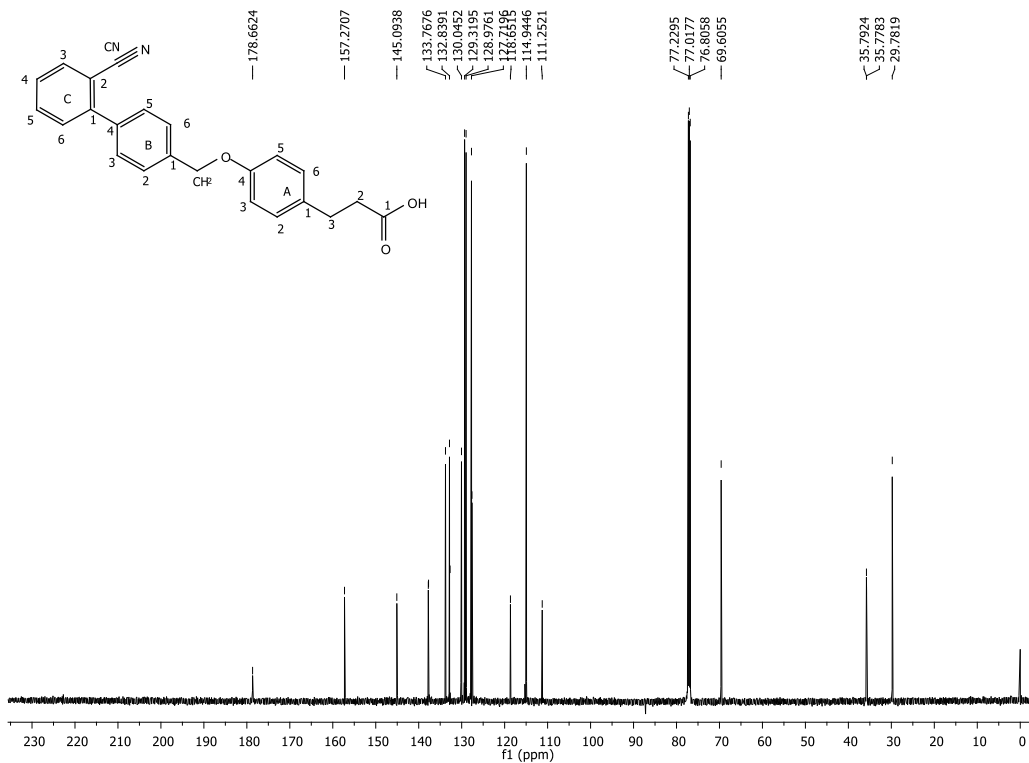
Espectro 64. Espectro IE del compuesto ACB-9



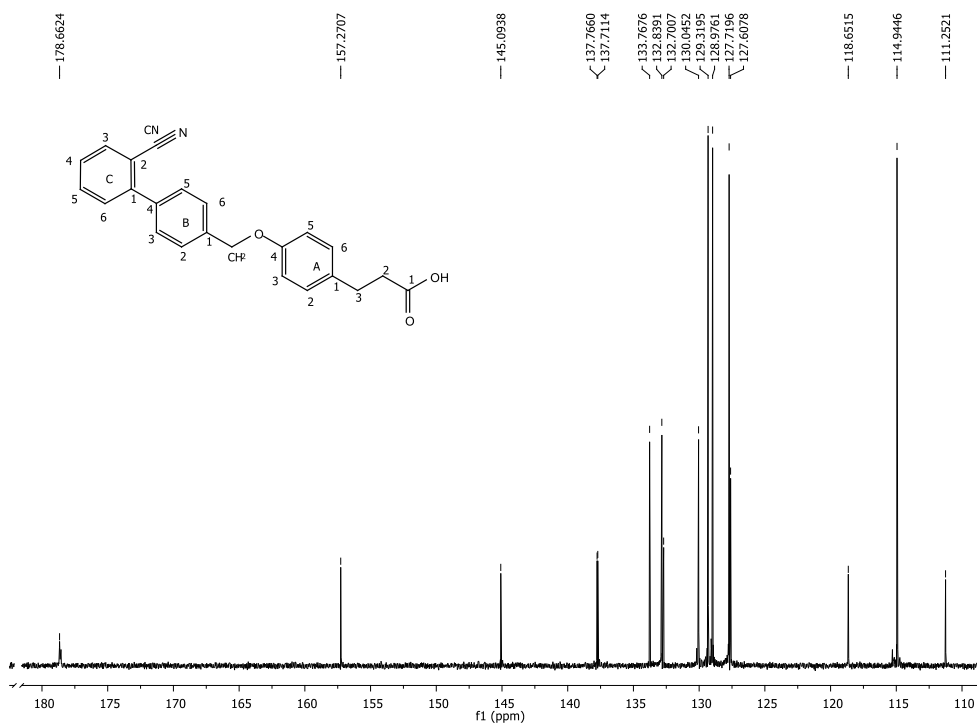
Spectro 65. Espectro RMN ¹H compuesto ACB-9.



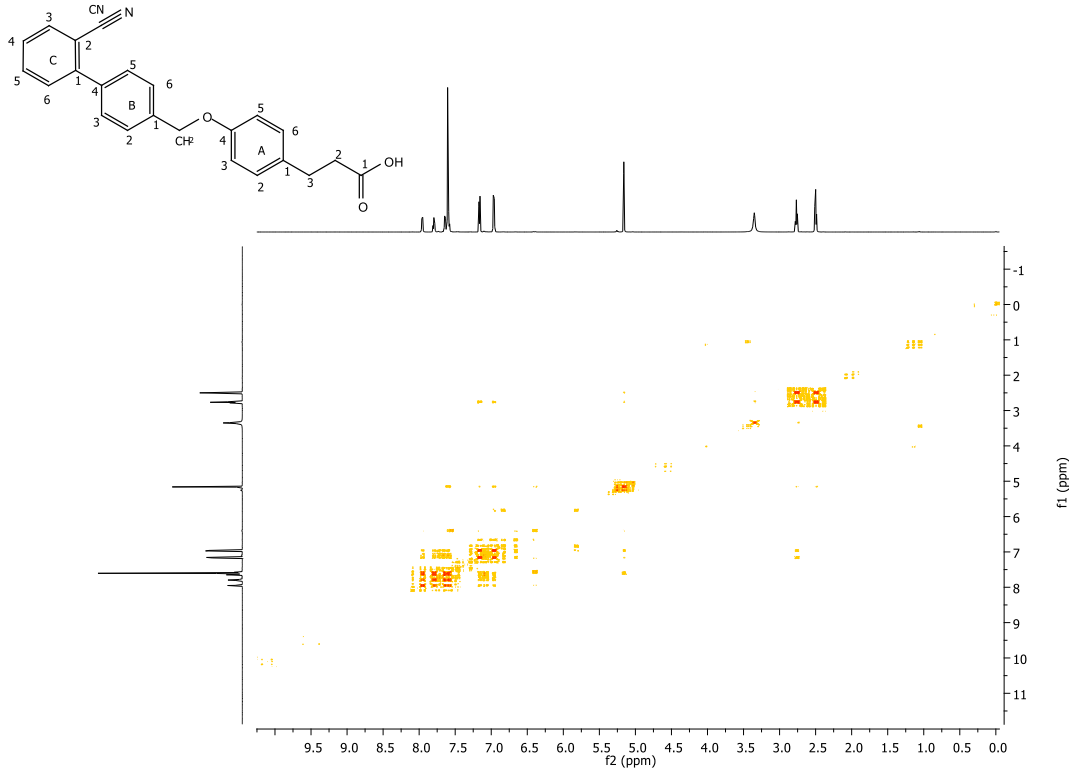
Spectro 66. Expansión zona aromática RMN ¹H compuesto ACB-9



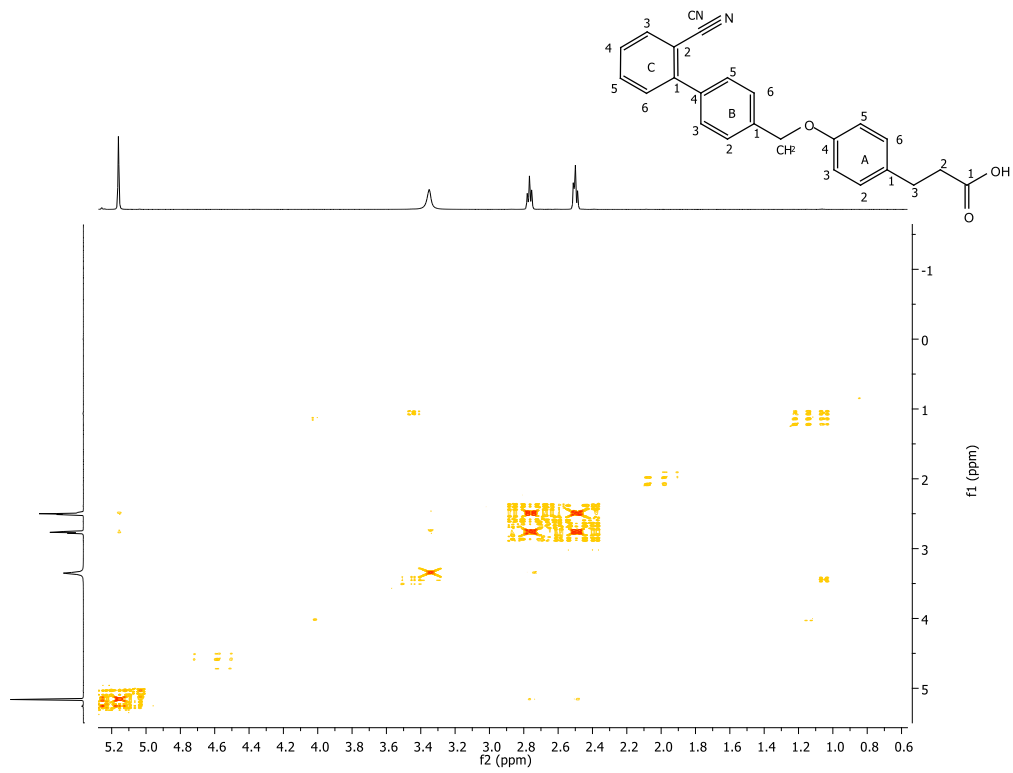
Espectro 67. Espectro RMN ¹³C compuesto ACB-9



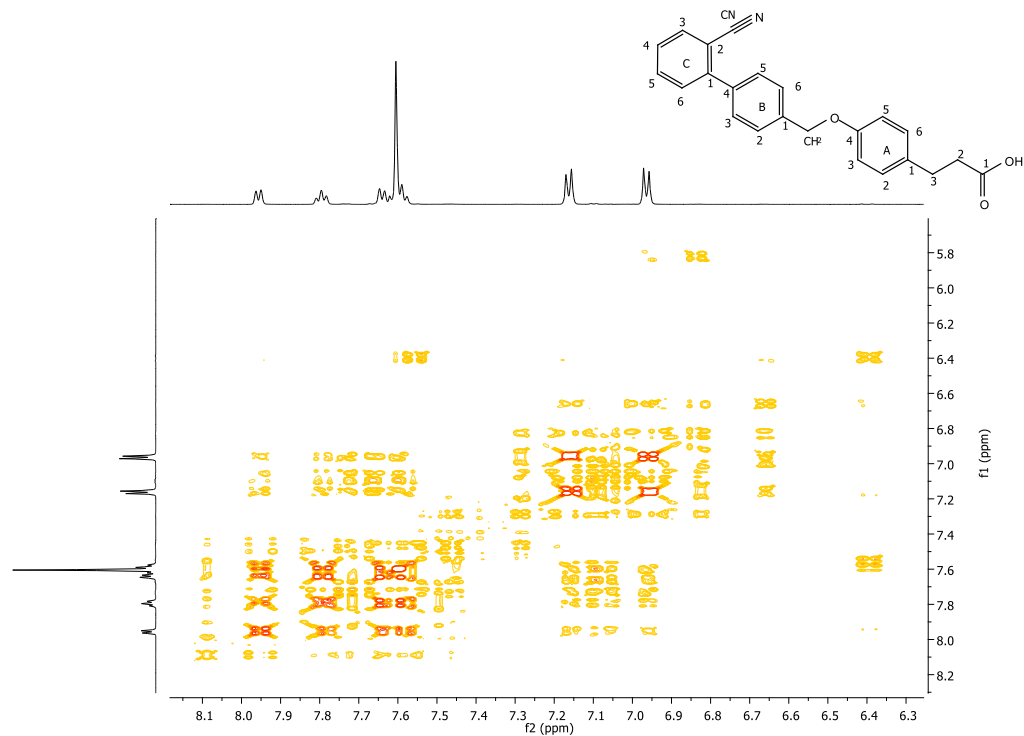
Espectro 68. Espectro RMN ¹³C zona aromática compuesto ACB-9



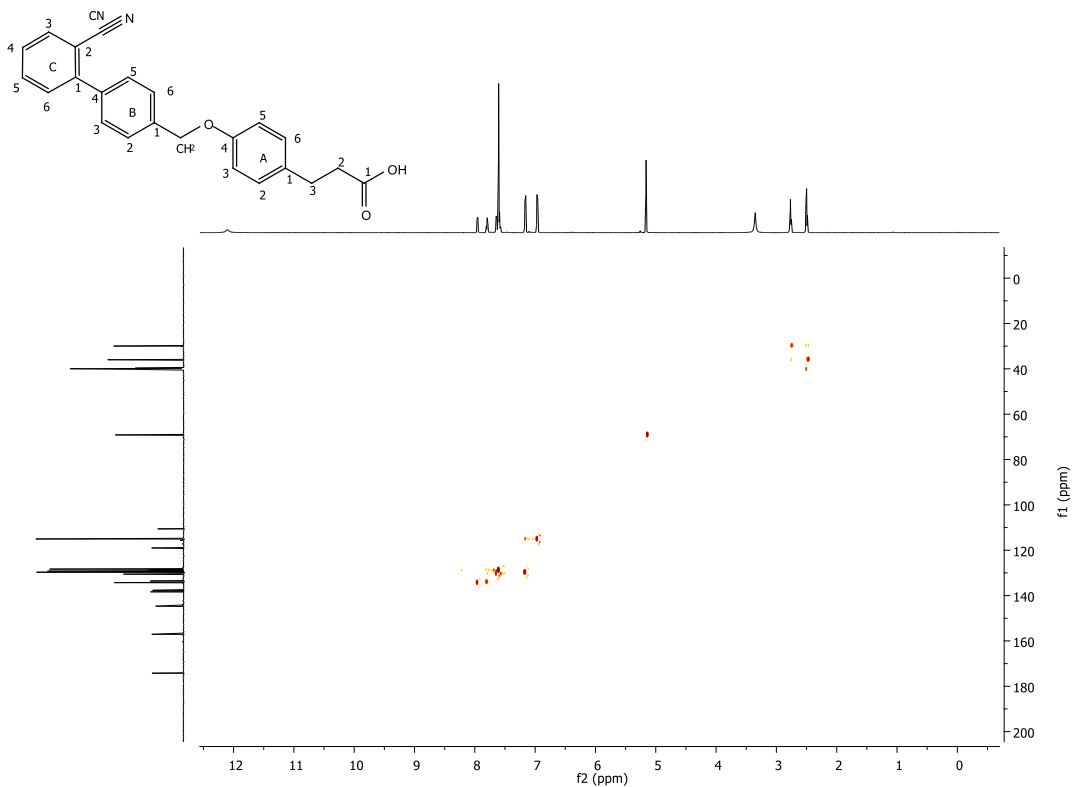
Espectro 69. Espectro COSY compuesto **ACB-9**



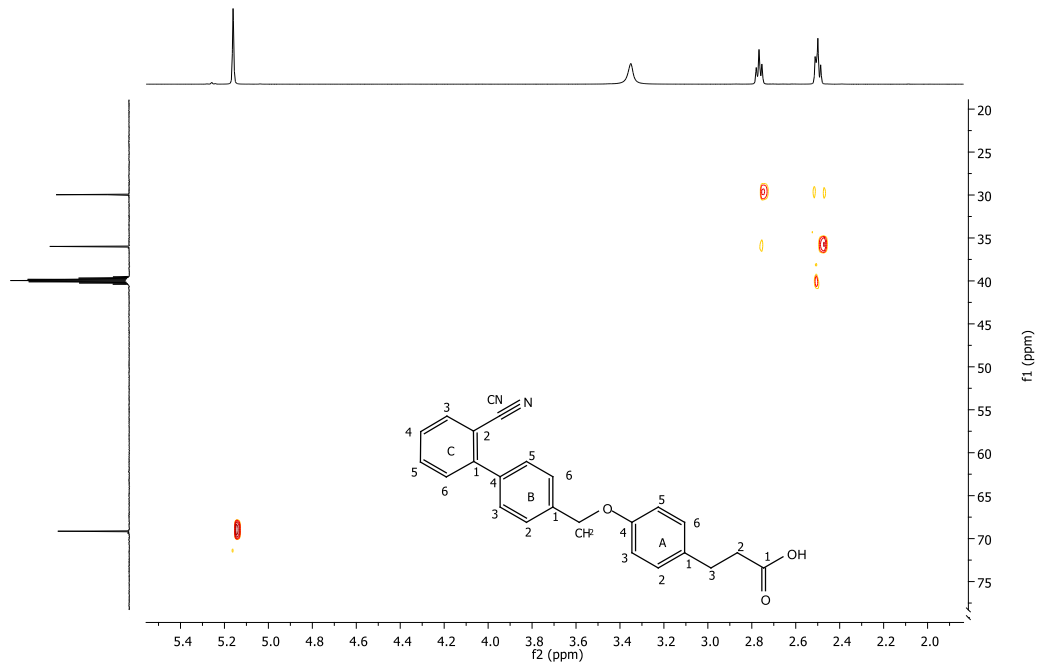
Espectro 70. Espectro COSY, zona alifática compuesto **ACB-9**.



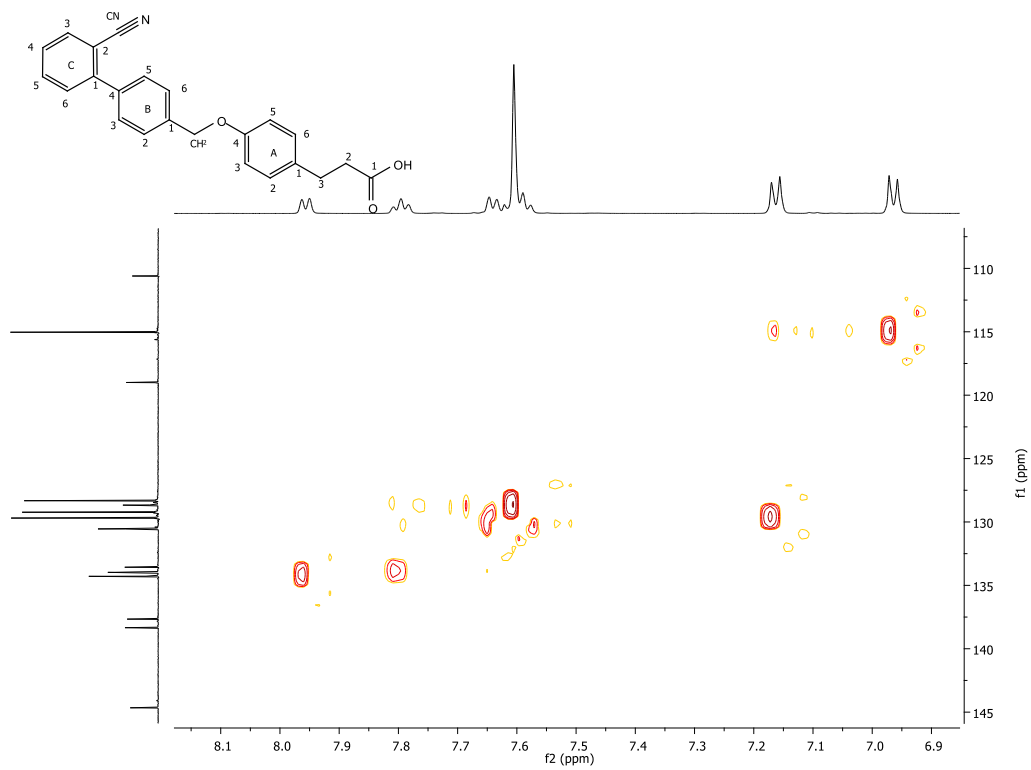
Espectro 71. Espectro COSY, zona aromática compuesto ACB-9



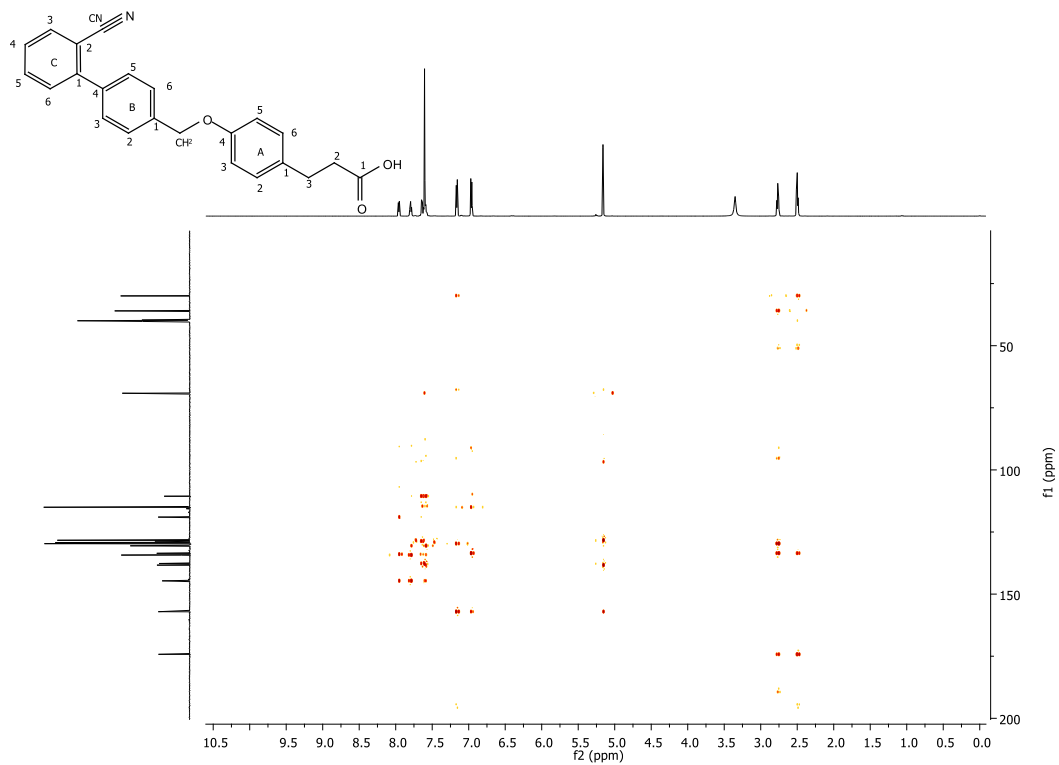
Espectro 72. Espectro HSQC compuesto ACB-9



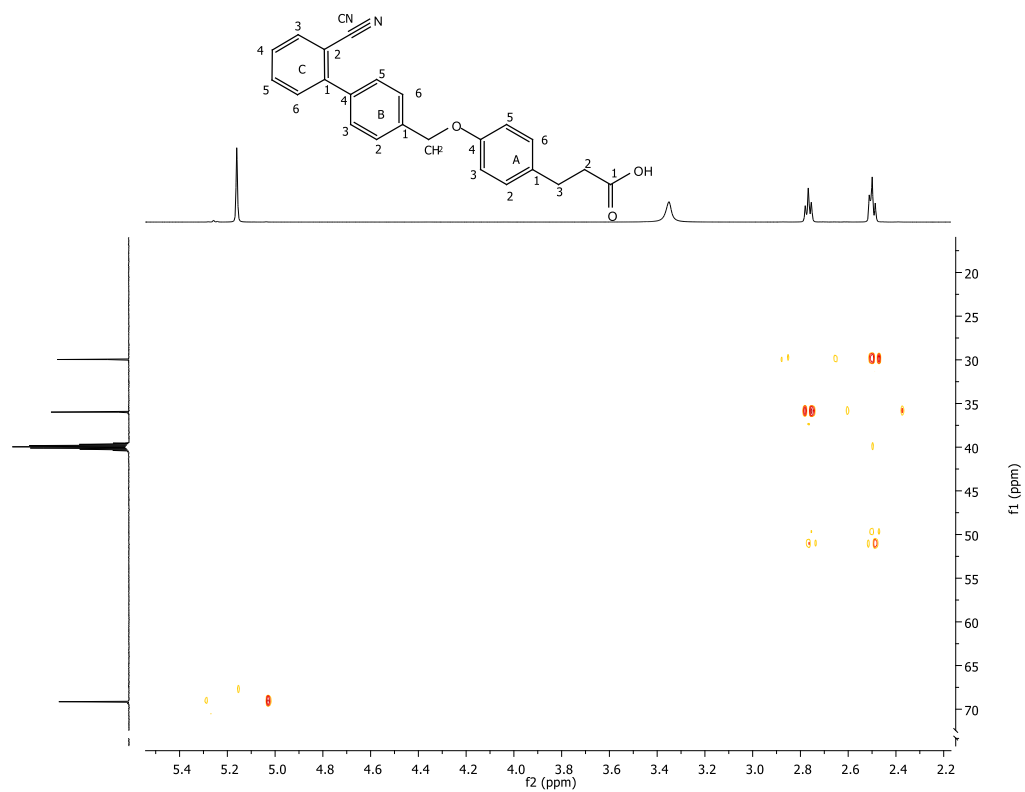
Espectro 73. Espectro HSQC, zona alifática compuesto ACB-9



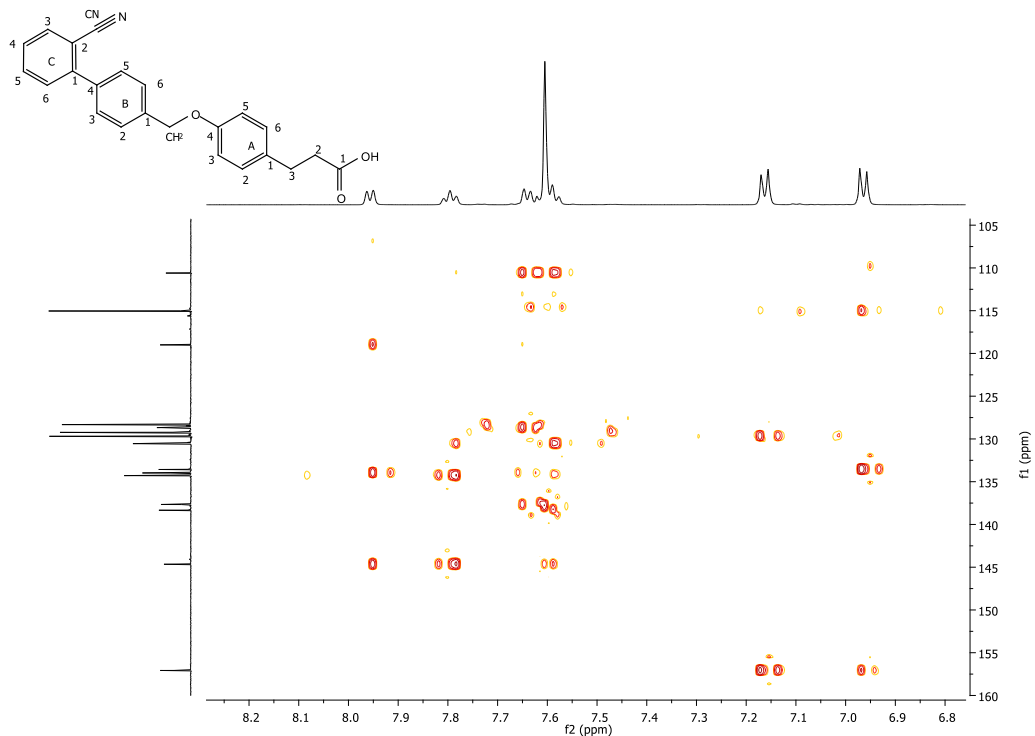
Espectro 74. Espectro HSQC, zona aromática compuesto ACB-9.



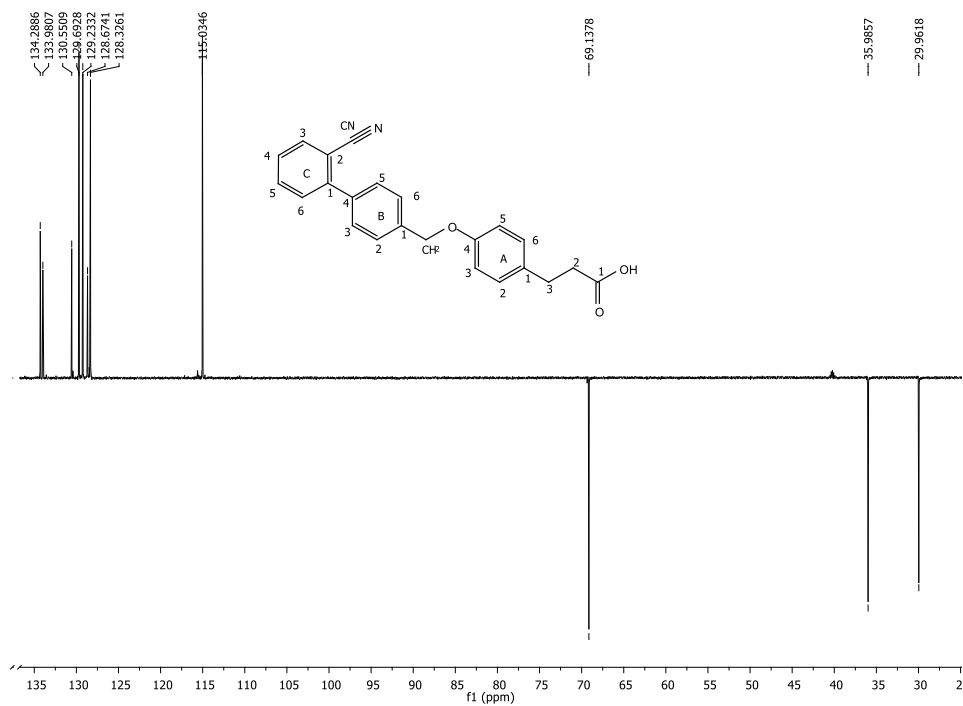
Espectro 75. Espectro HMBC compuesto ACB-9.



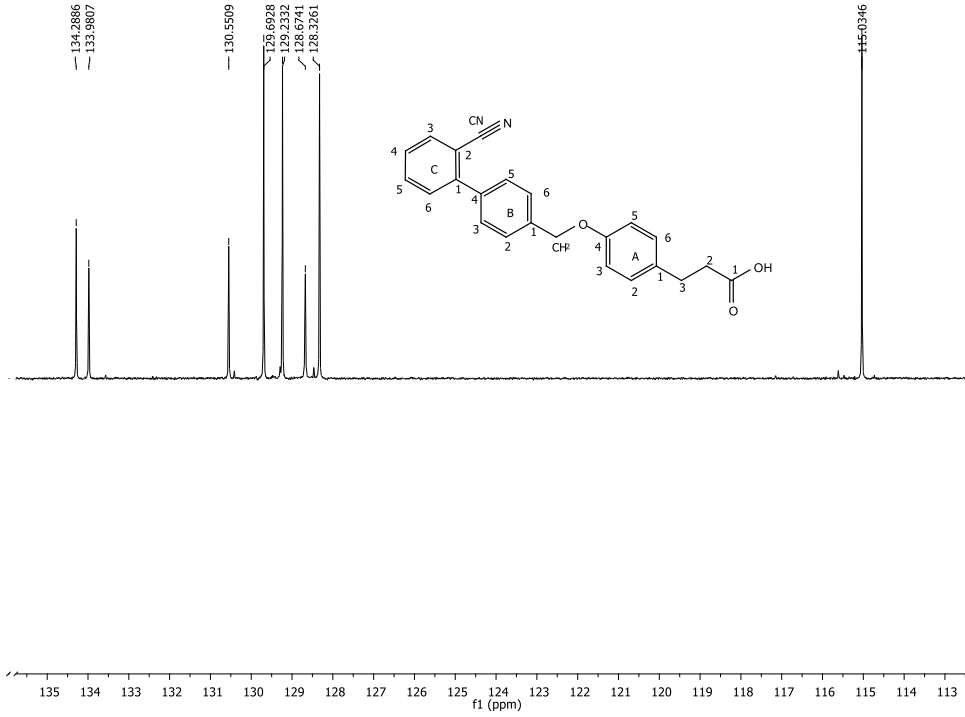
Espectro 76. Espectro HMBC zona alifática compuesto ACB-9.



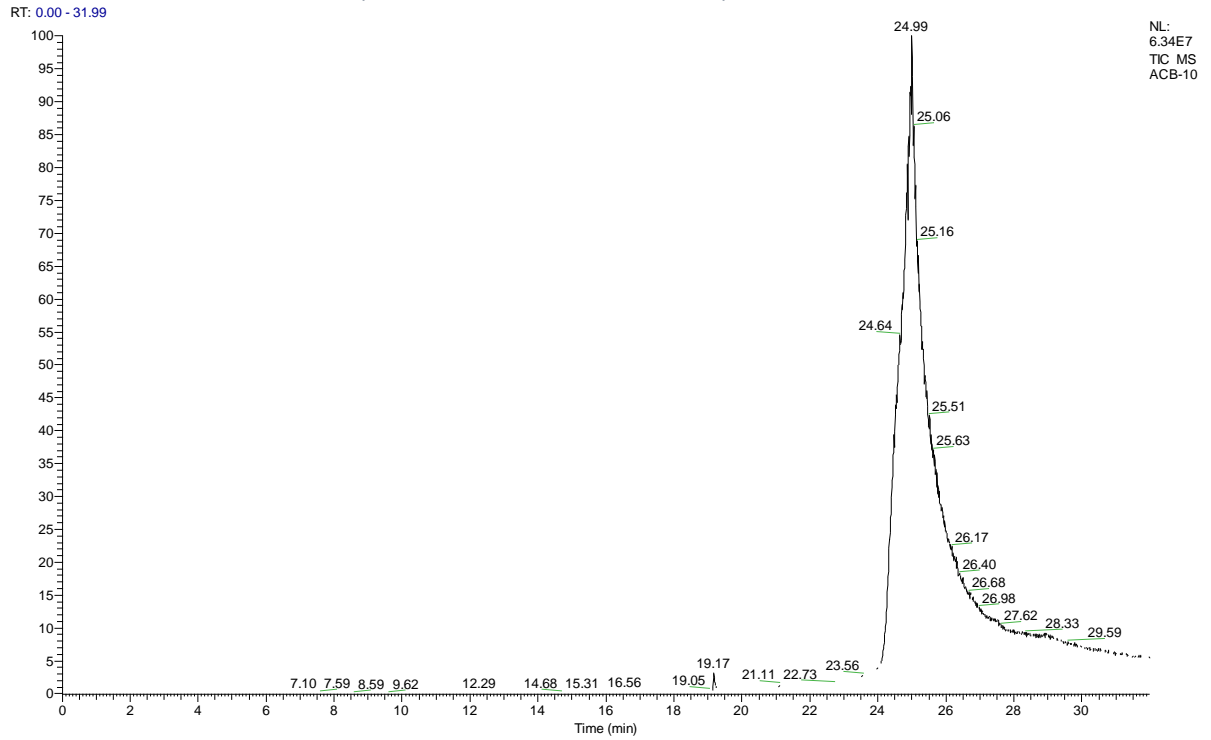
Espectro 77. Espectro HMBC zona aromática compuesto ACB-9.



Espectro 78. Espectro DEPT compuesto ACB-9

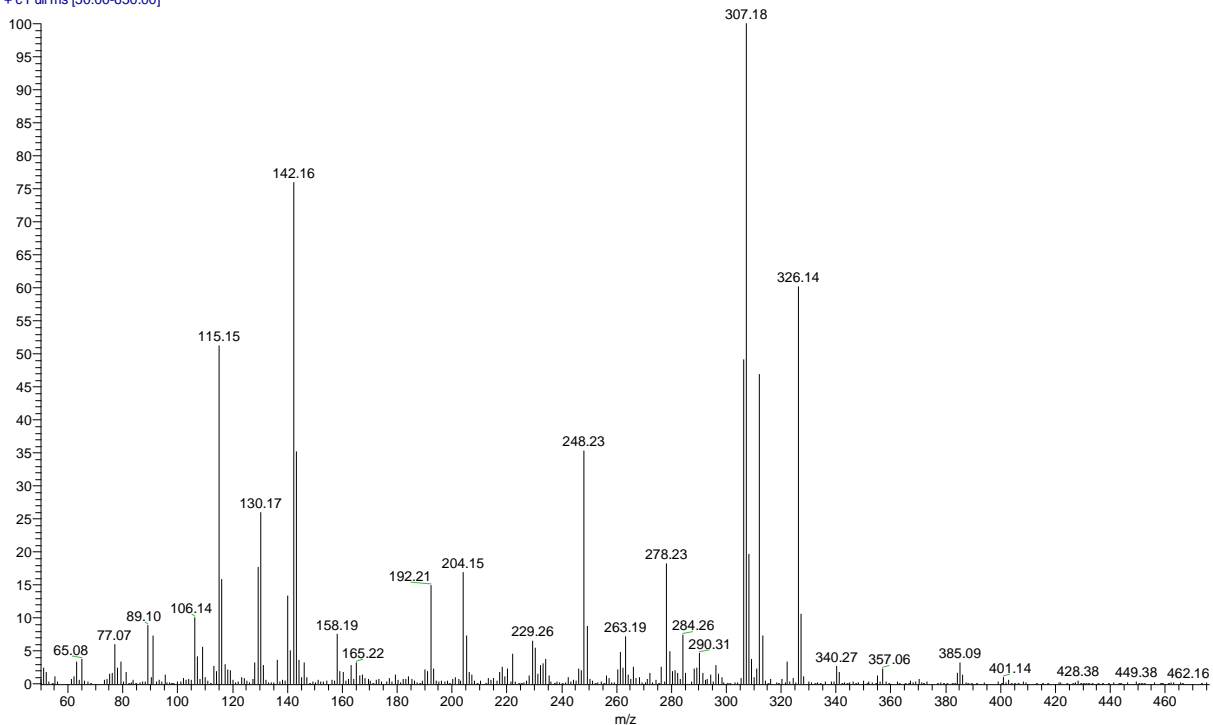


Espectro 79. Zona aromática DEPT compuesto ACB-9

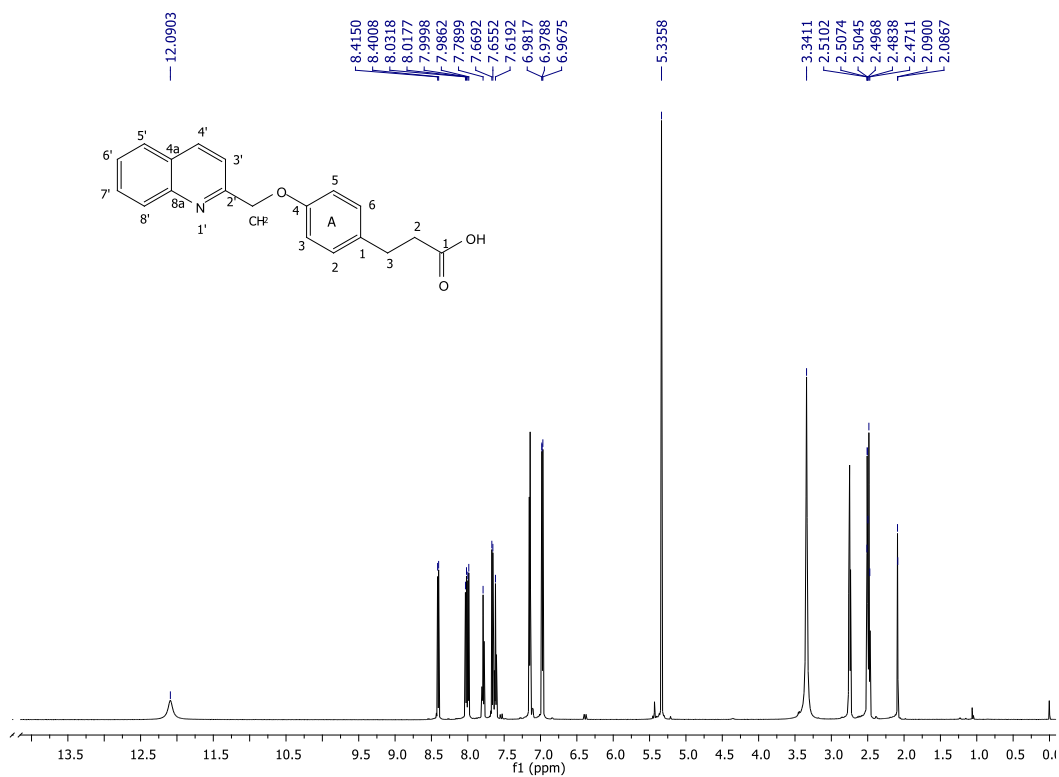


Espectro 80. Cromatograma del compuesto ACB-10

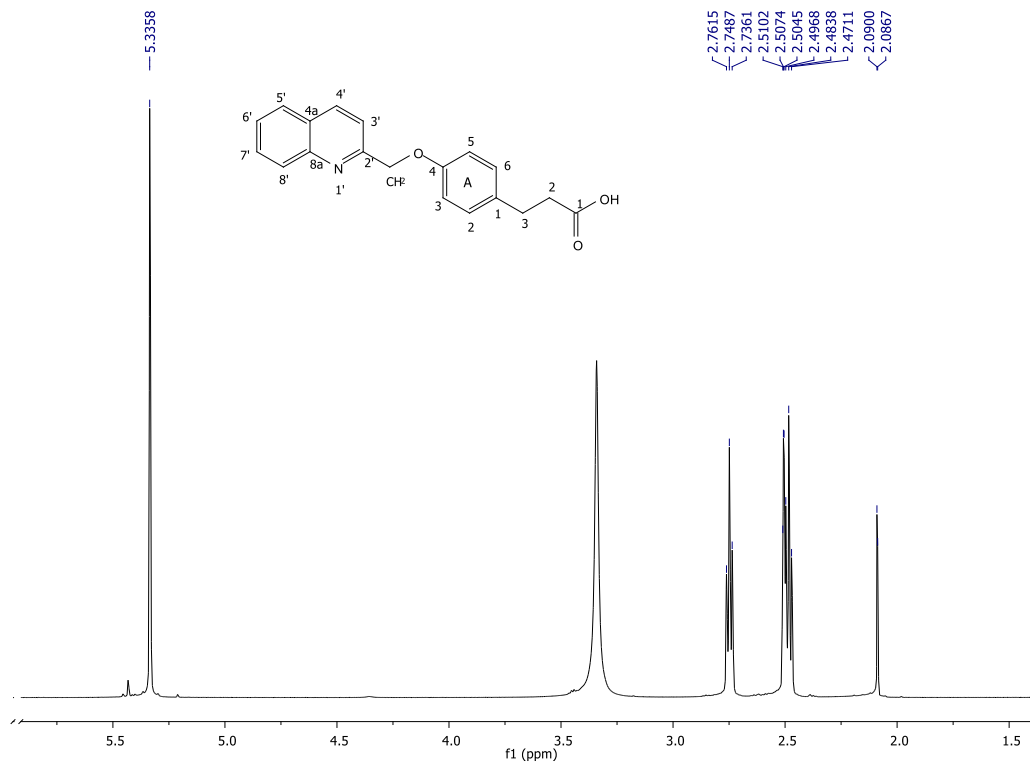
ACB-10 #1852 RT: 25.03 AV: 1 SB: 1549 27.02-31.99, 13.95-24.02 NL: 5.29E6
T: + c Full ms [50.00-650.00]



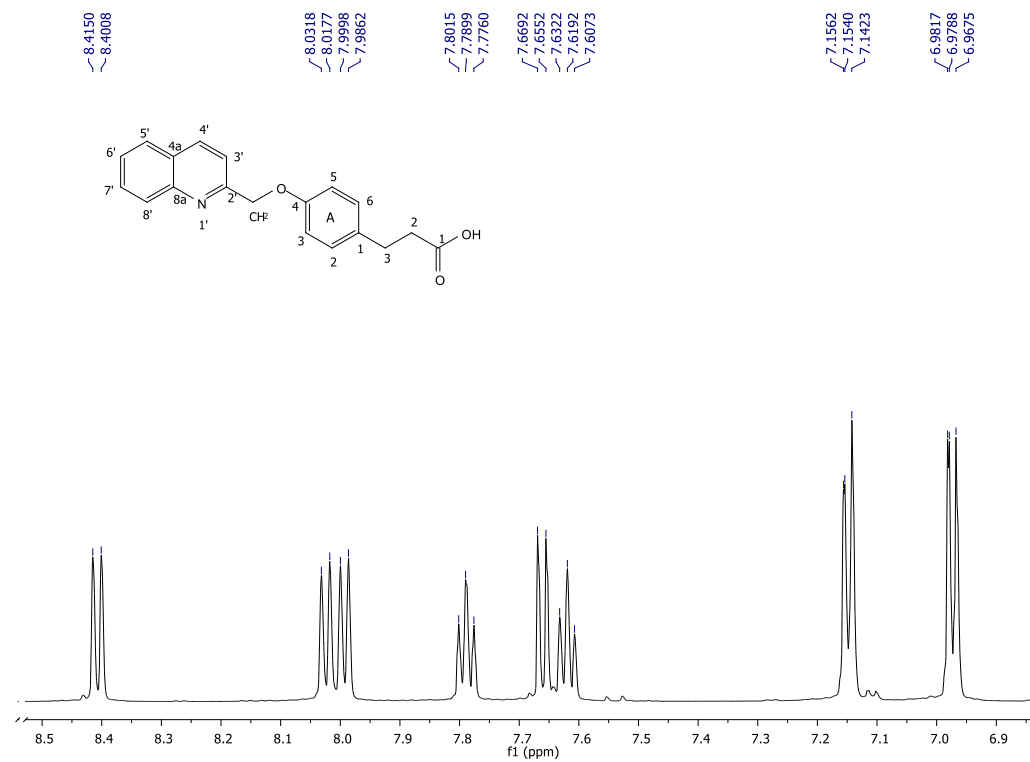
Espectro 81. Espectro IE del compuesto ACB-10



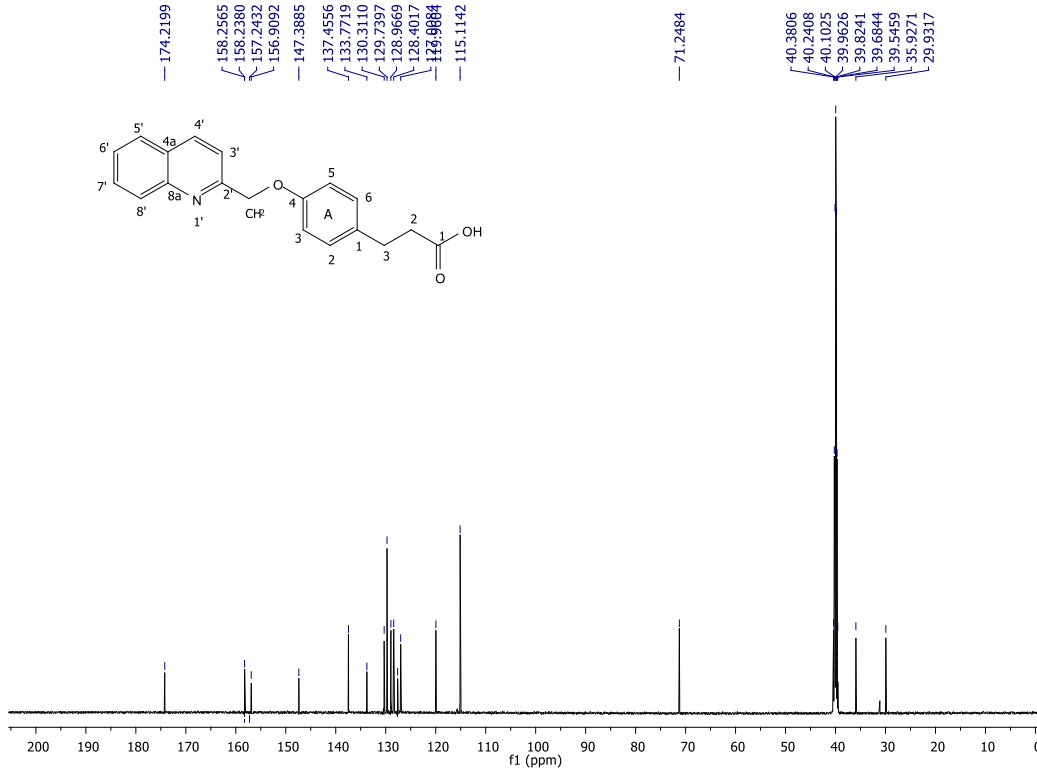
Espectro 82. Espectro RMN ¹H compuesto ACB-10



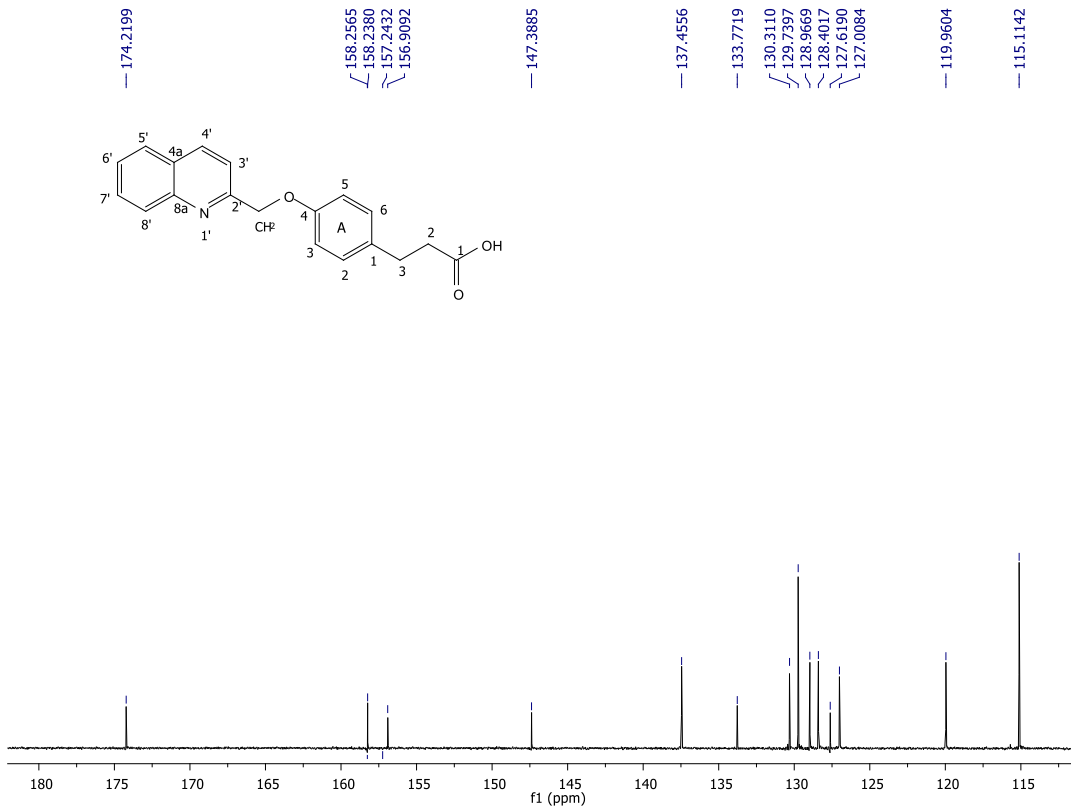
Espectro 83. Espectro RMN ¹H zona alifática compuesto ACB-10



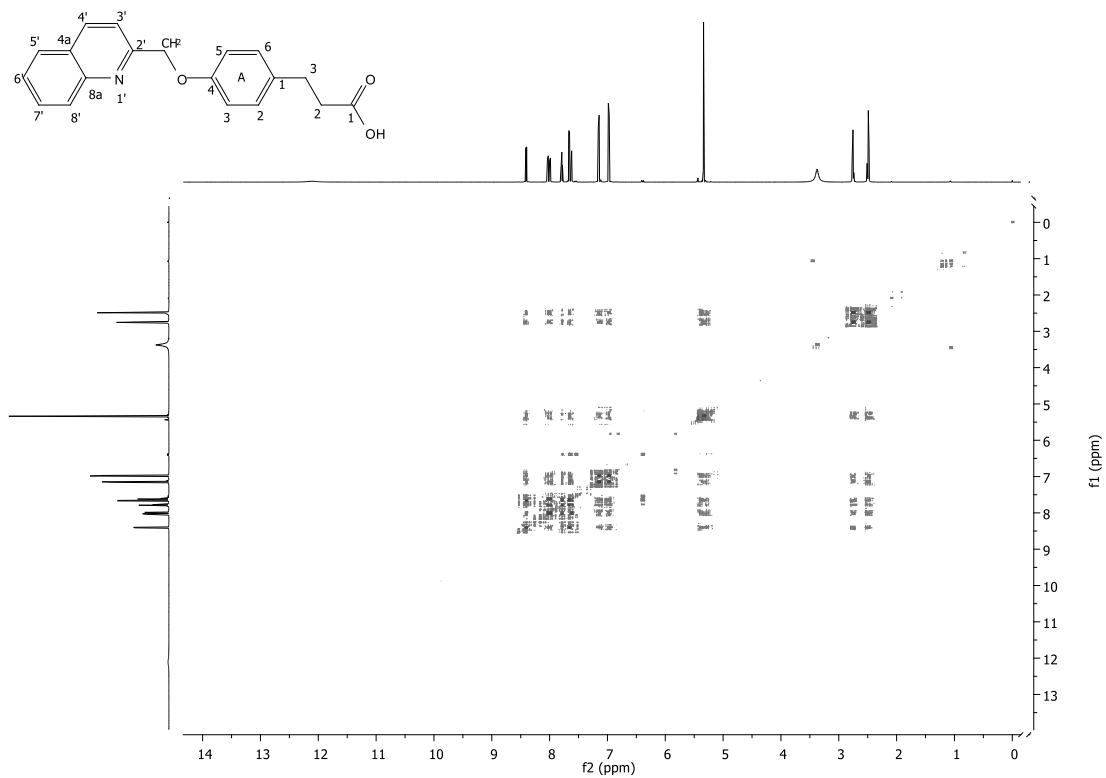
Espectro 84. Expansión zona aromática RMN ¹H compuesto ACB-10



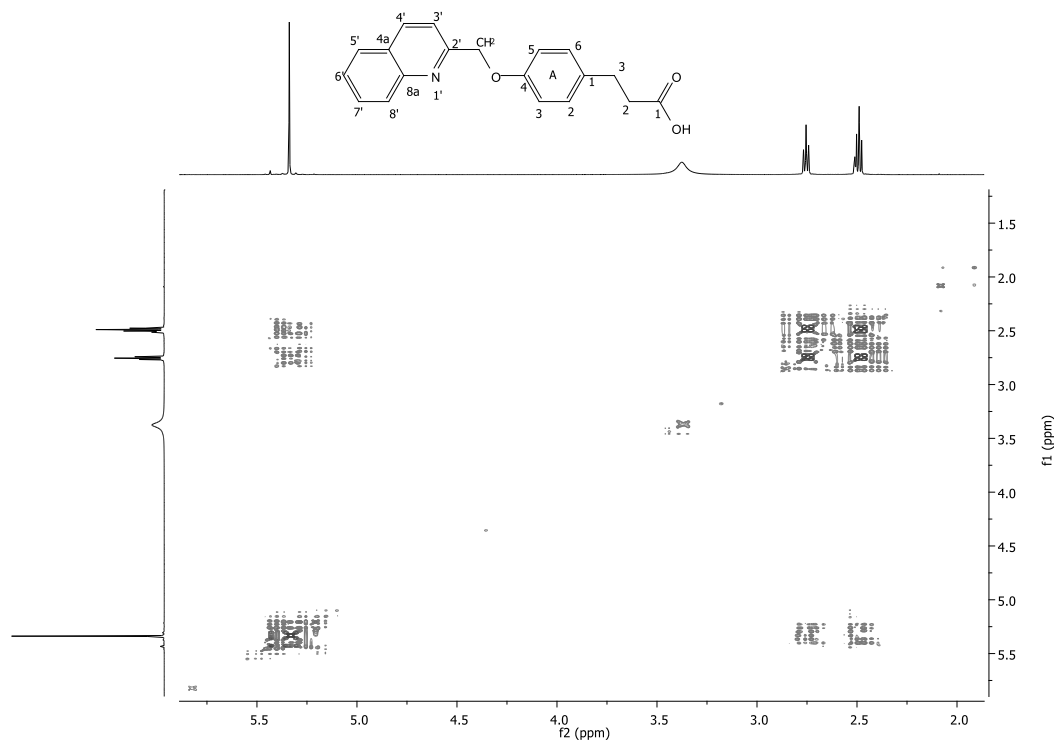
Espectro 85. Espectro RMN ¹³C compuesto ACB-10



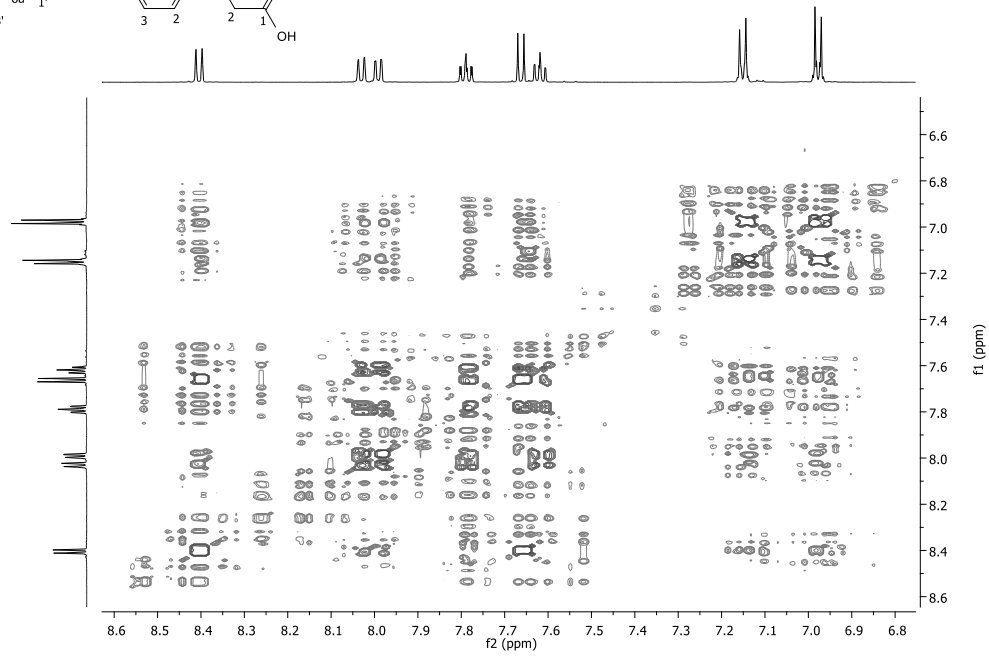
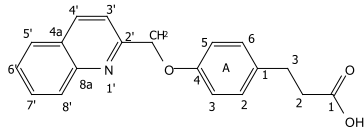
Espectro 86. Espectro RMN ¹³C zona aromática compuesto ACB-10



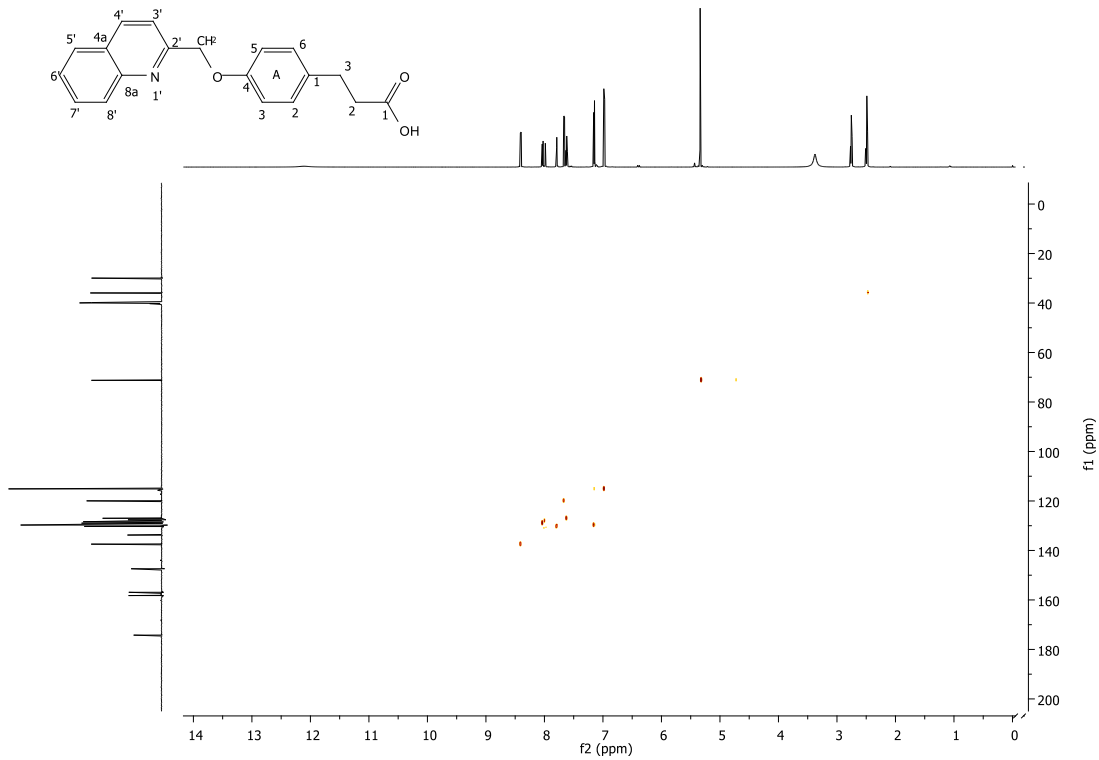
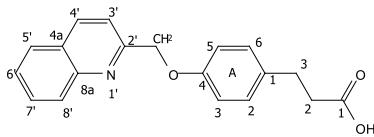
Espectro 87. Espectro COSY compuesto ACB-10



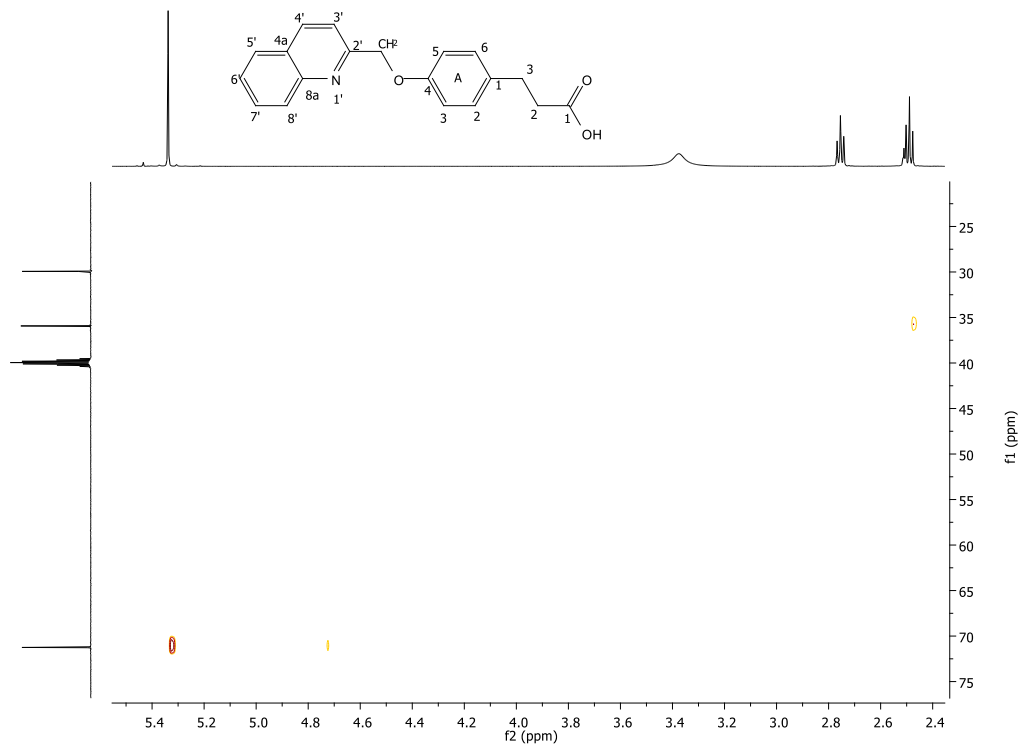
Espectro 88. Espectro COSY zona alifática compuesto ACB-10



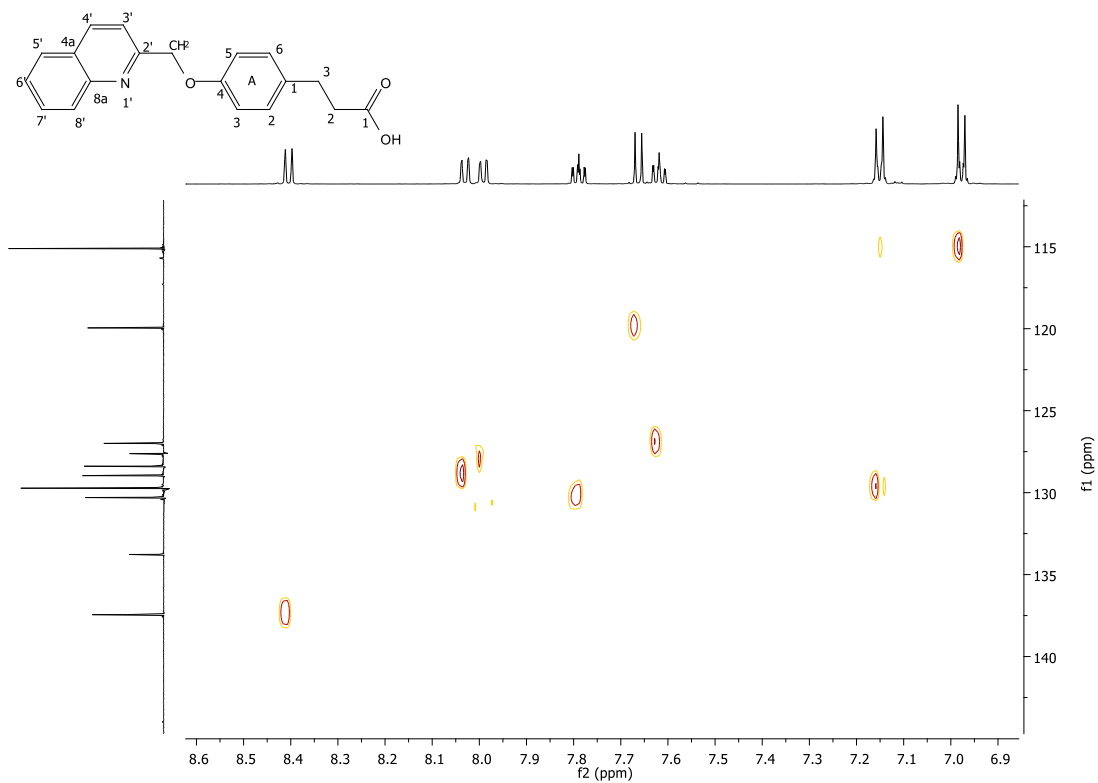
Espectro 89. Espectro COSY zona aromática compuesto ACB-10



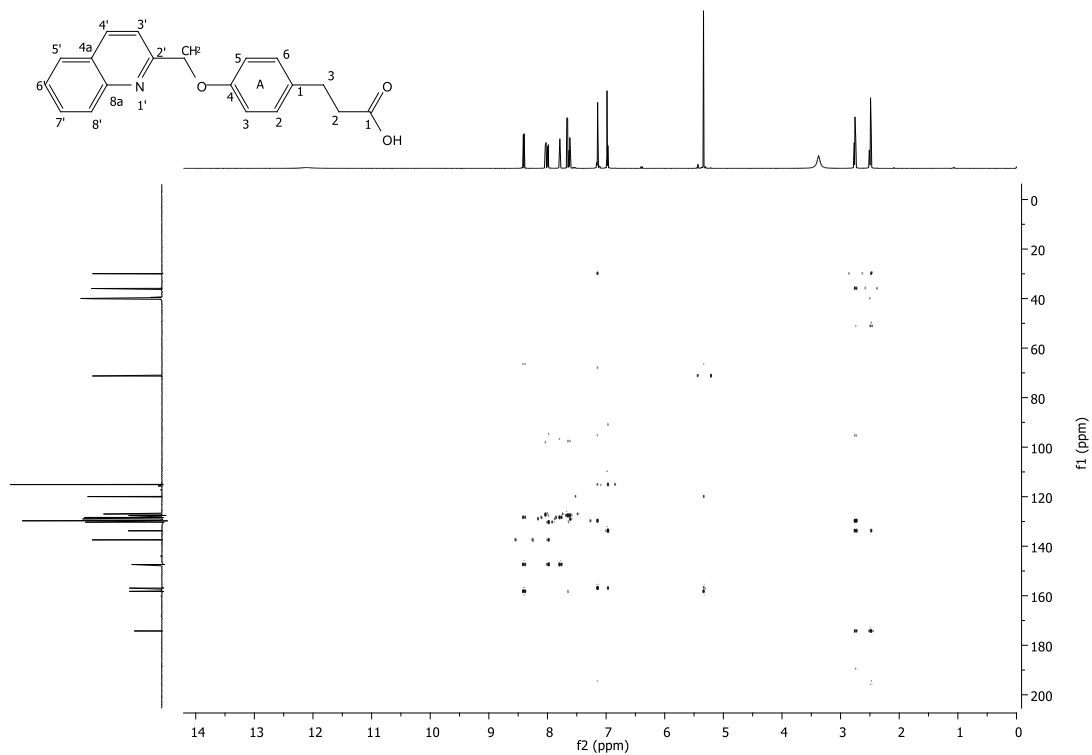
Espectro 90. Espectro HSQC compuesto ACB-10



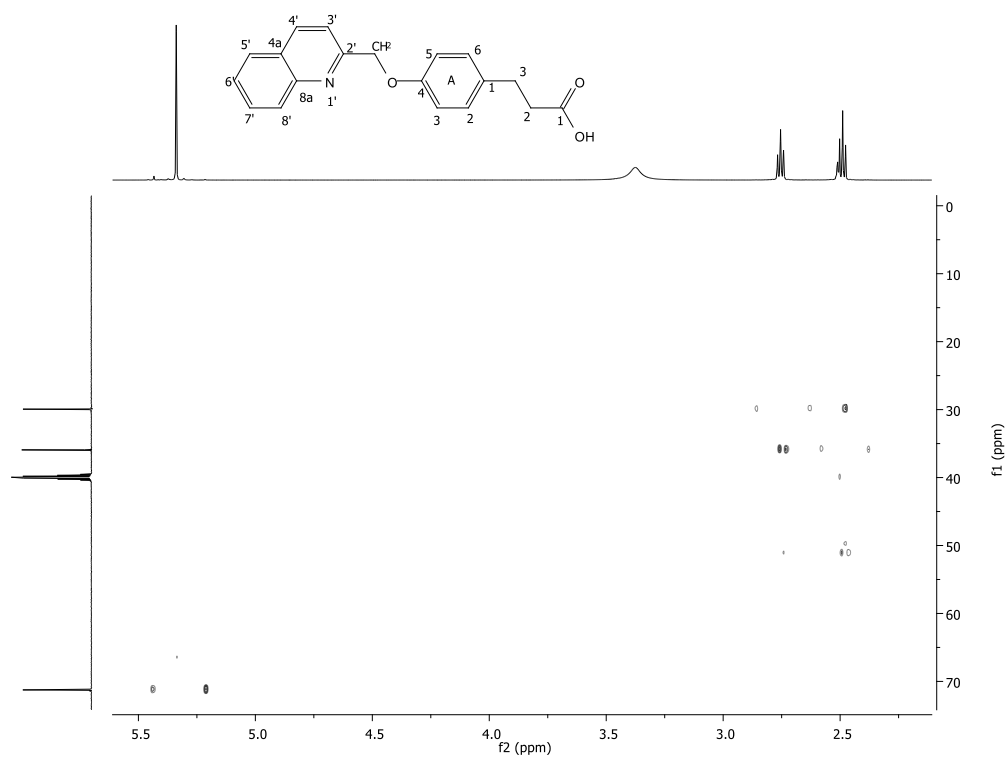
Spectro 91. Espectro HSQC zona alifática compuesto ACB-10



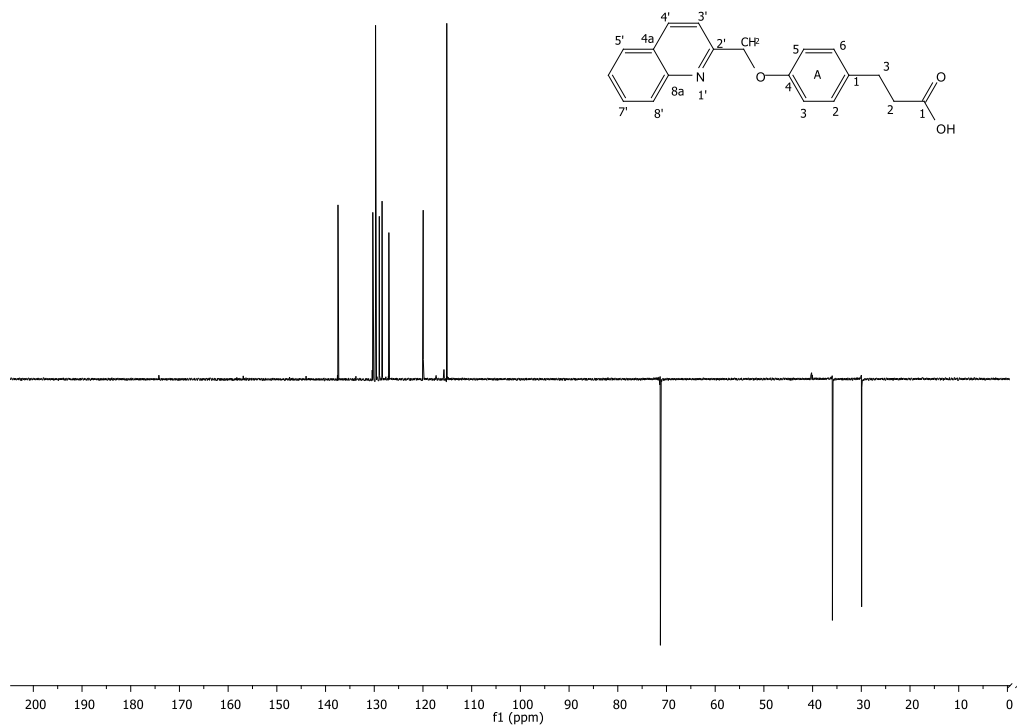
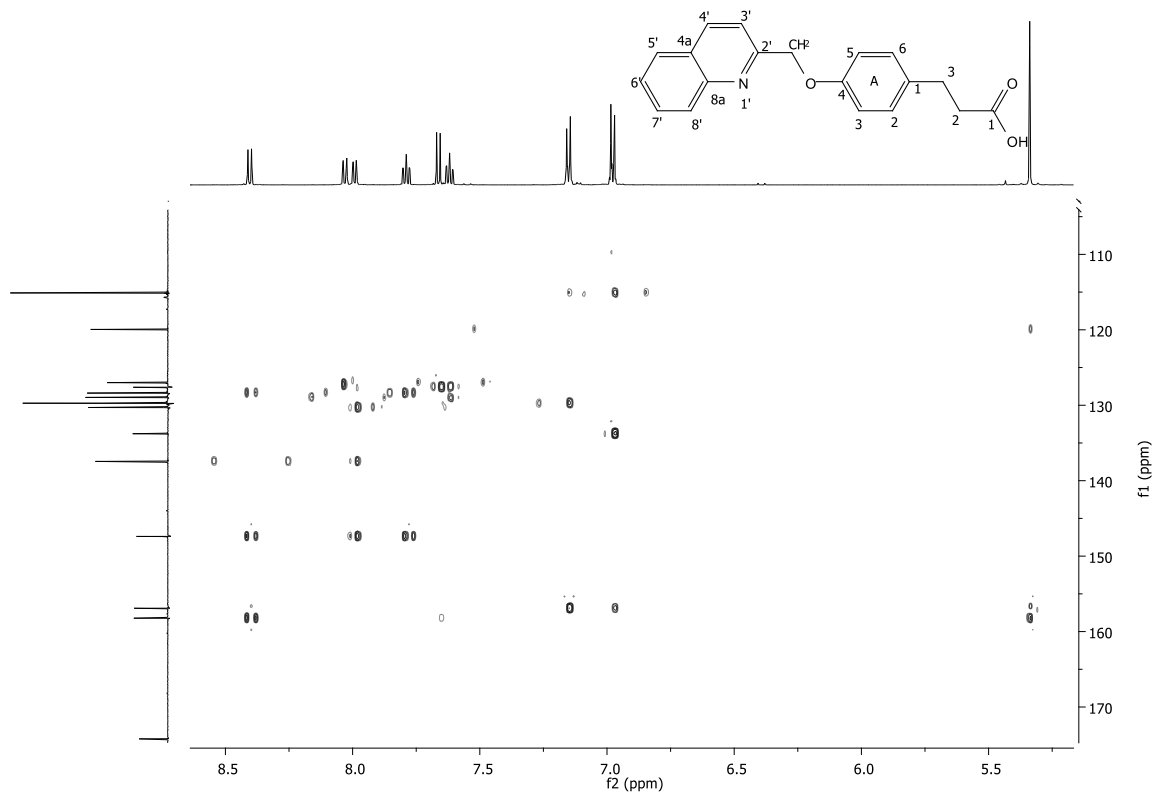
Spectro 92. Espectro HSQC zona aromática compuesto ACB-10



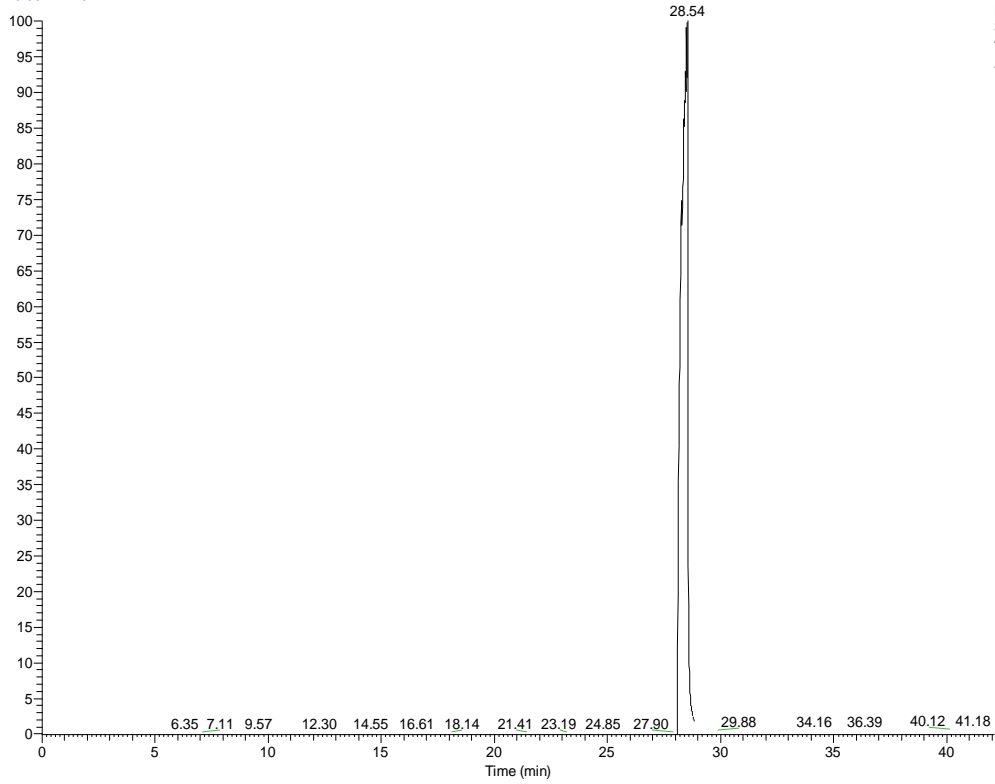
Espectro 93. Espectro HMBC compuesto ACB-10



Espectro 94. Espectro HMBC zona alifática compuesto ACB-10



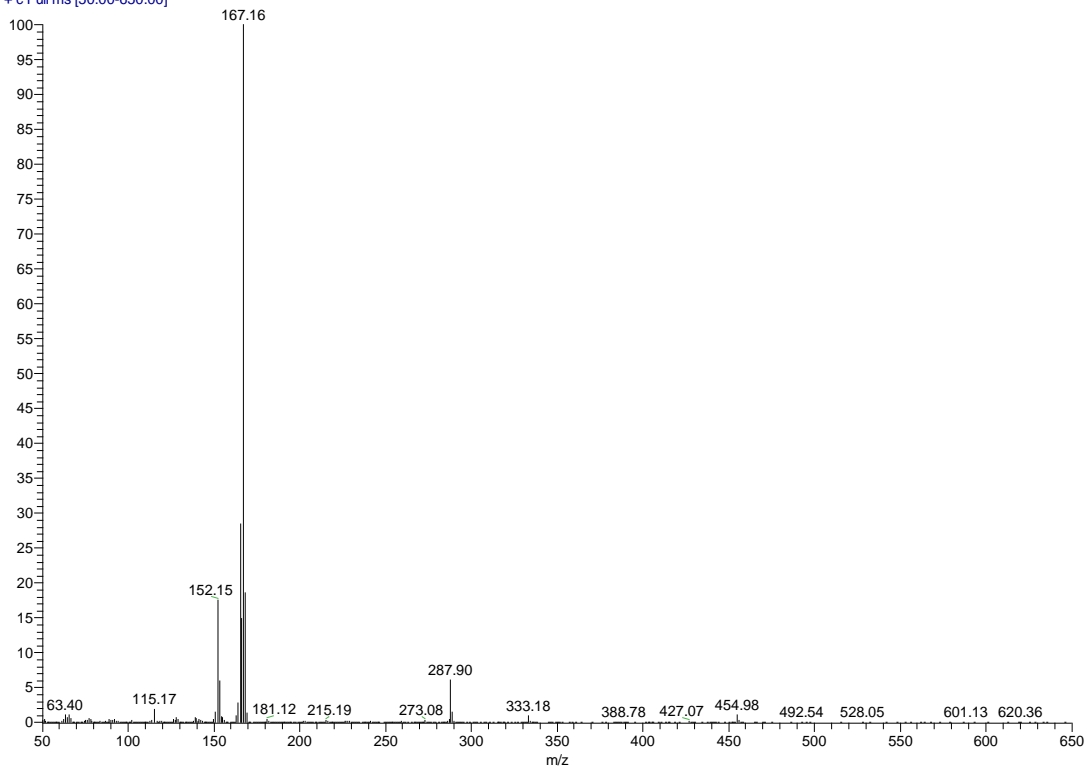
RT: 0.00 - 42.10



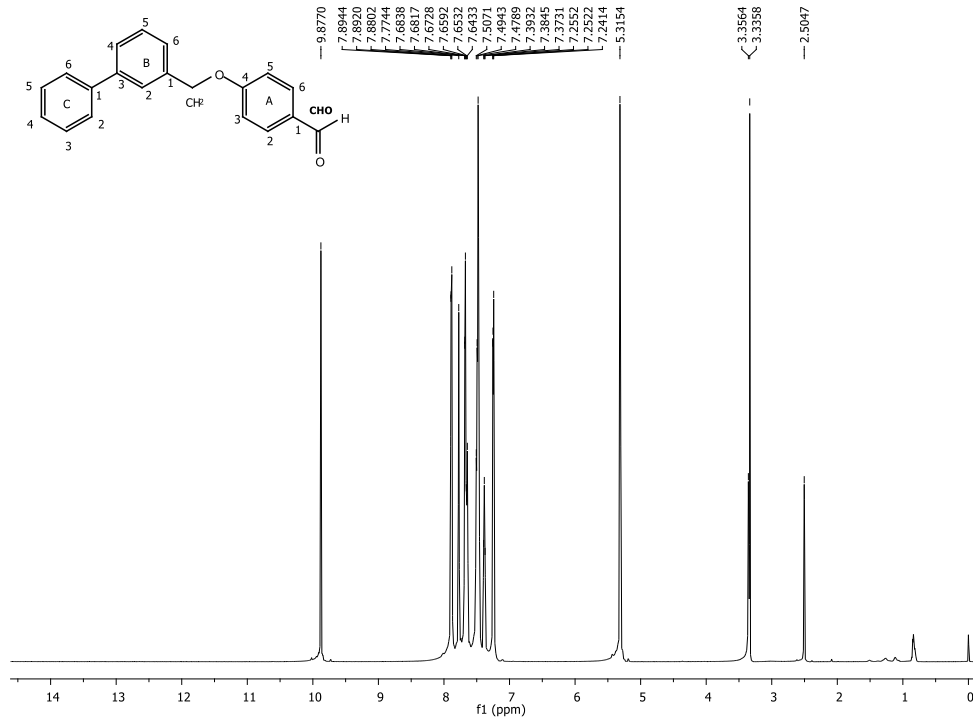
NL:
3.86E8
TIC MS
ACB9

Espectro 97. Cromatograma compuesto 11

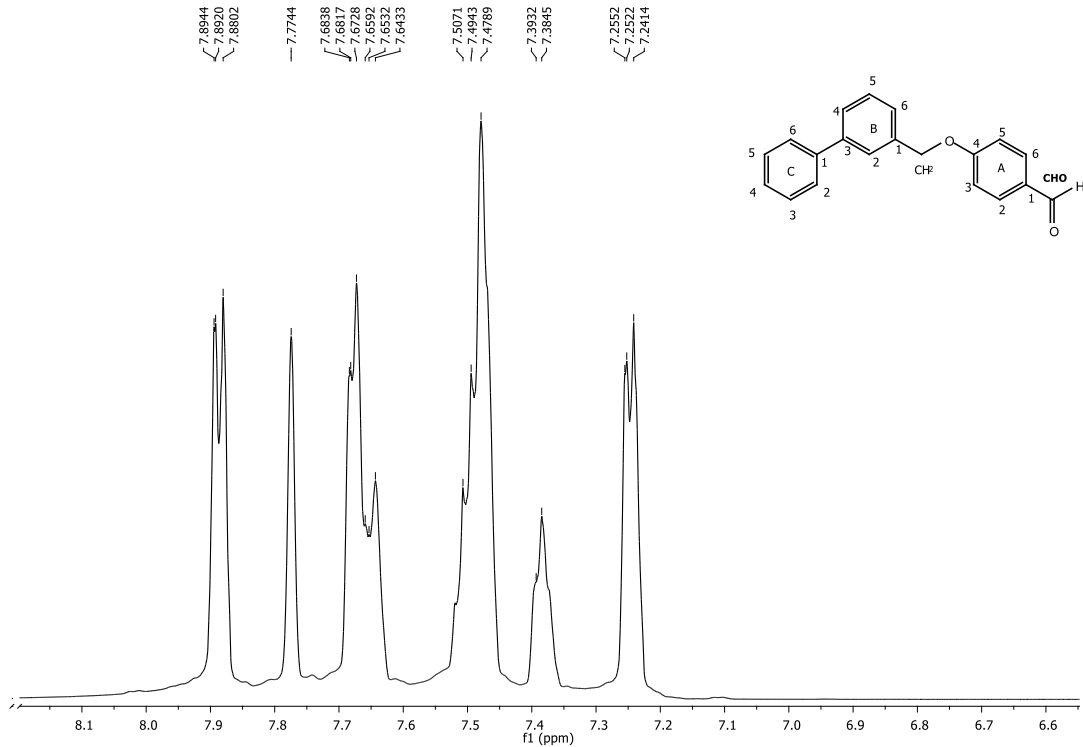
ACB9 #2345 RT: 28.52 AV: 1 NL: 1.65E8
T: + c Full ms [50.00-650.00]



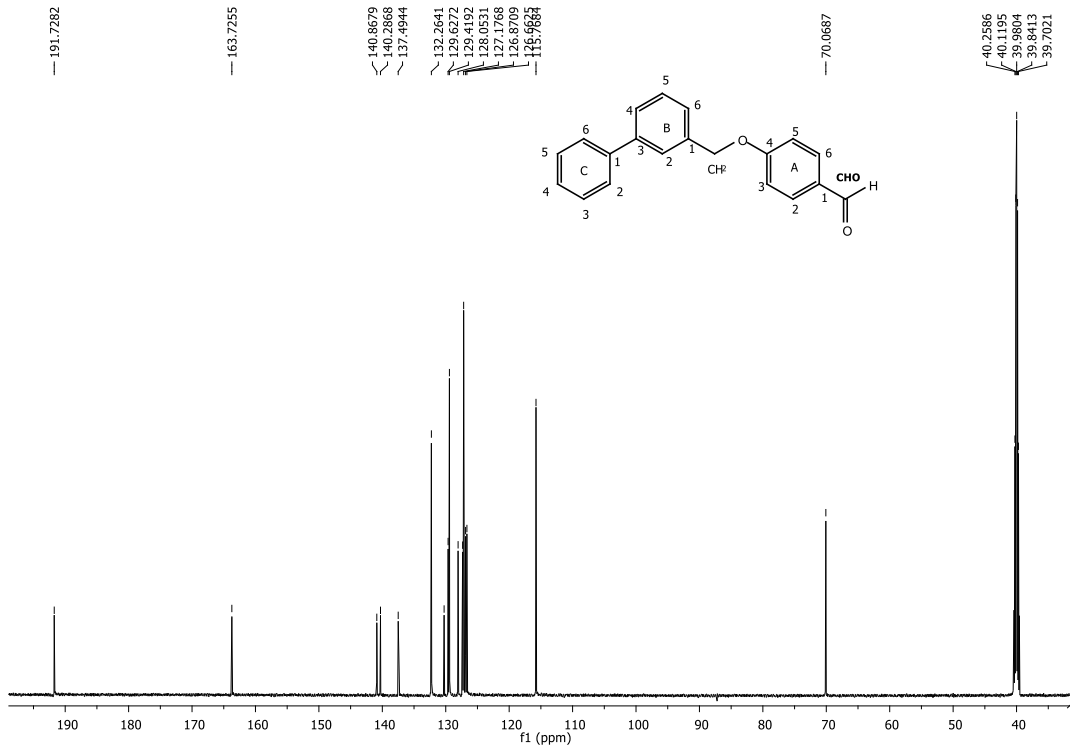
Espectro 98. Patrón de fragmentación del compuesto 11 modalidad IE



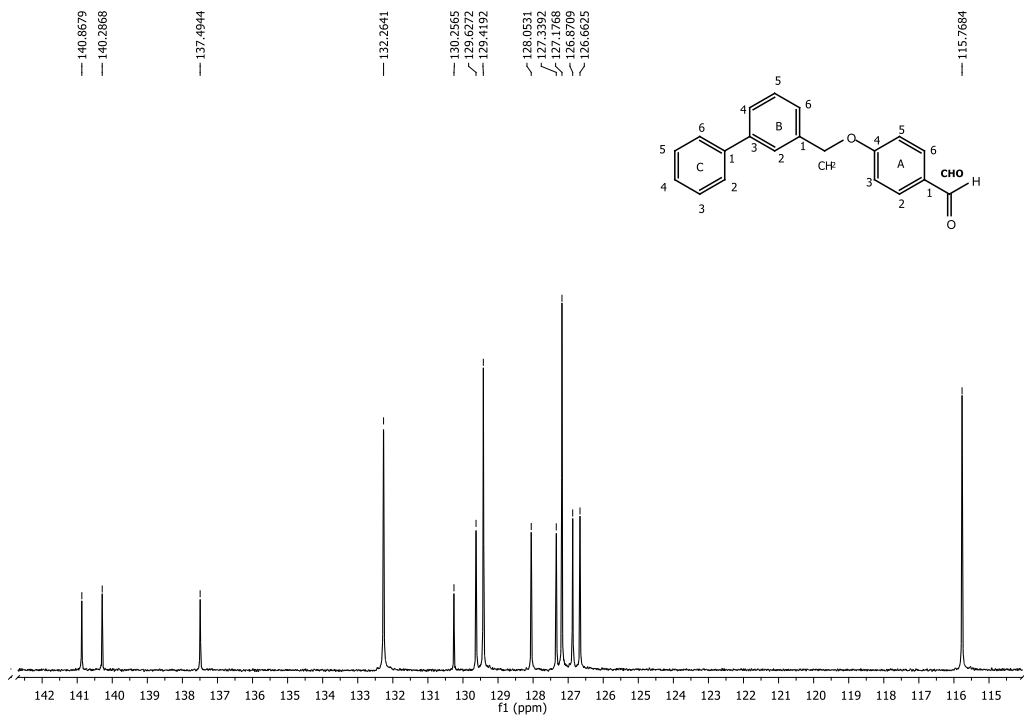
Espectro 99. Espectro RMN ¹H compuesto 11



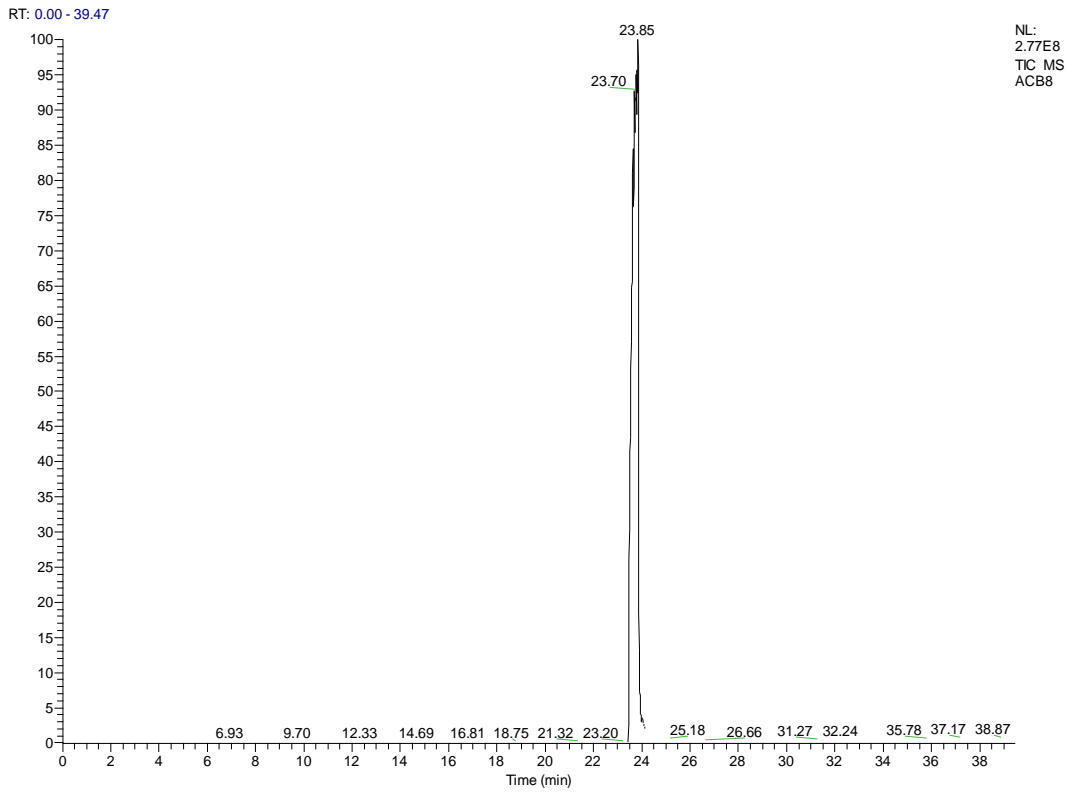
Espectro 100. Espectro RMN ¹H zona aromática compuesto 11



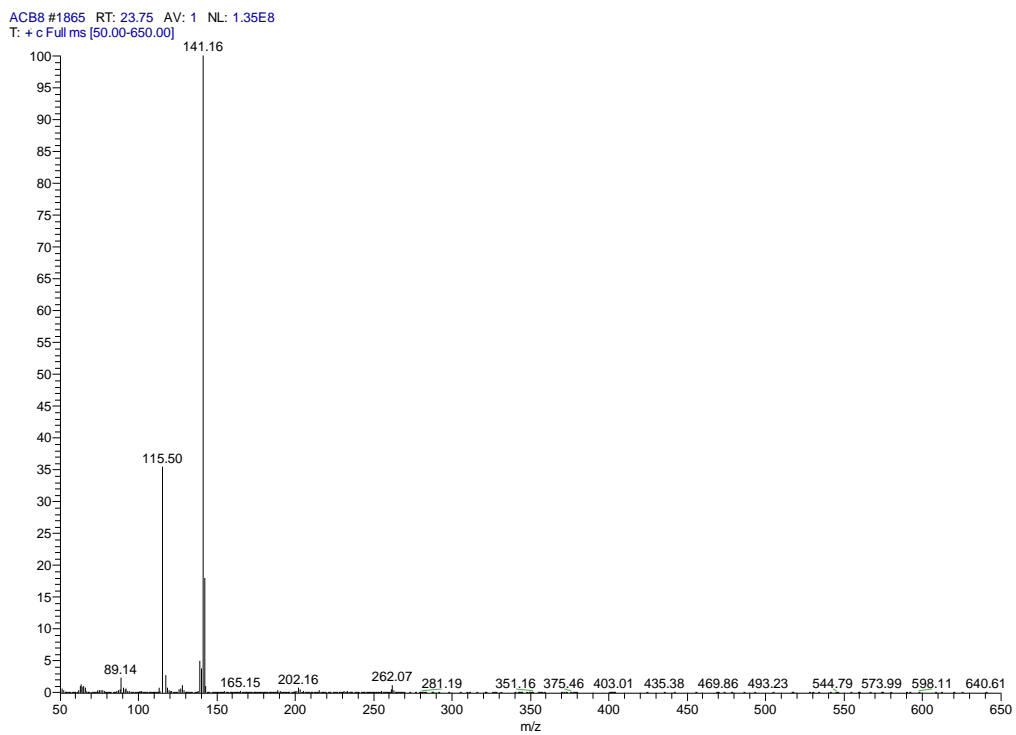
Espectro 101. Espectro RMN ¹³C compuesto 11



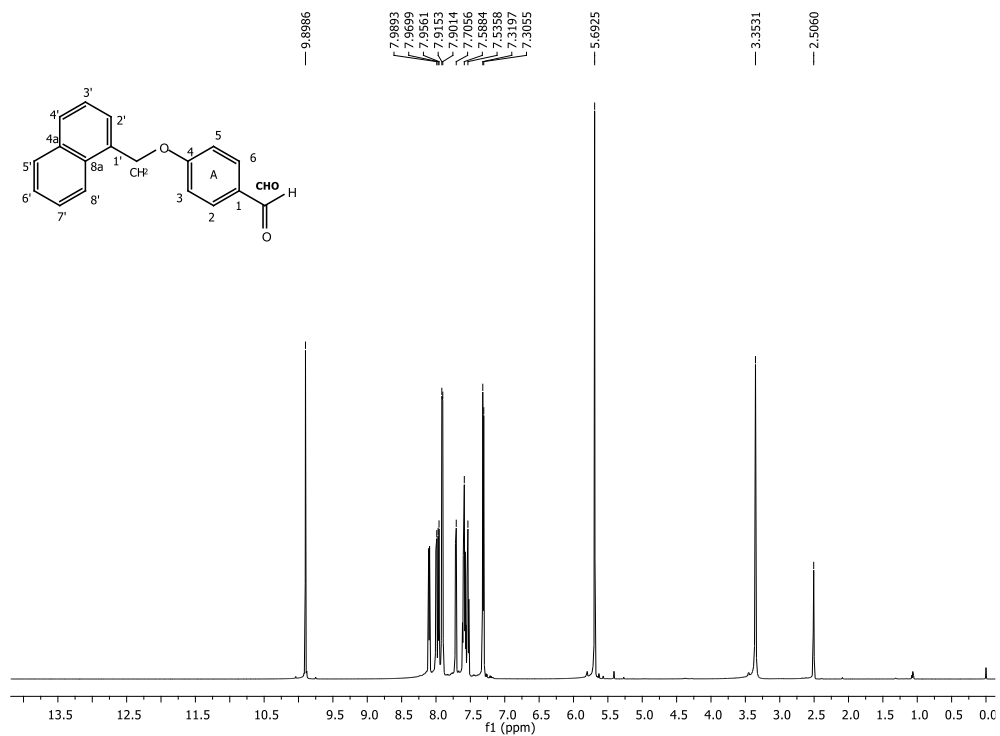
Espectro 102. Espectro RMN ¹³C zona aromática compuesto 11



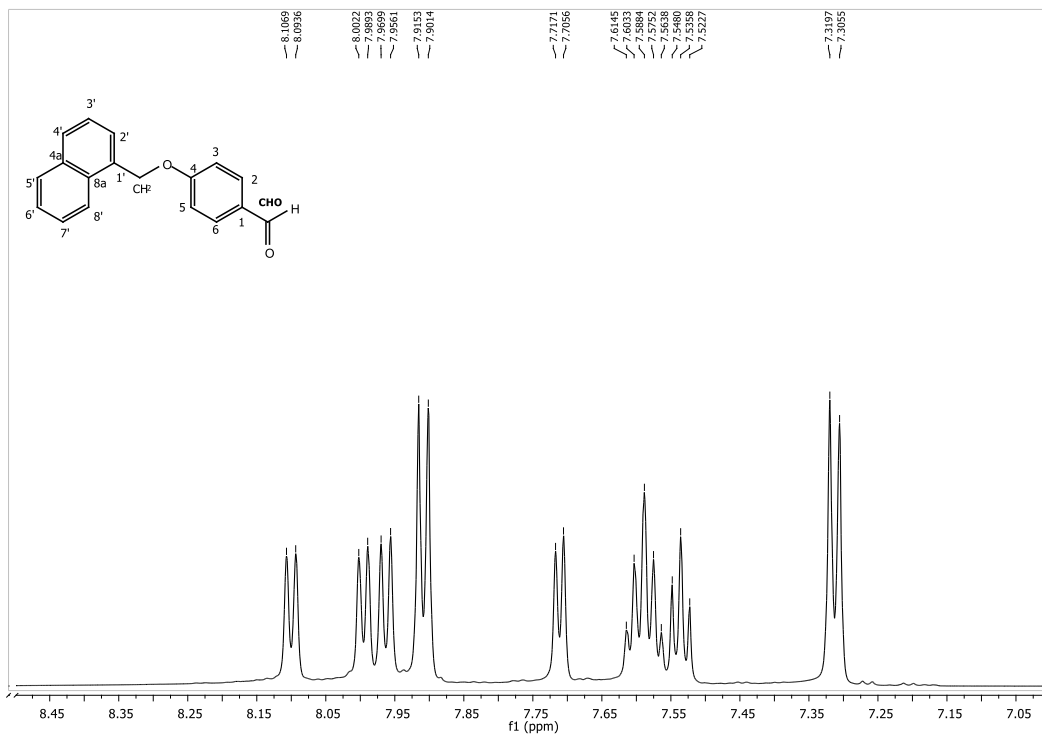
Espectro 103. Cromatograma compuesto 12



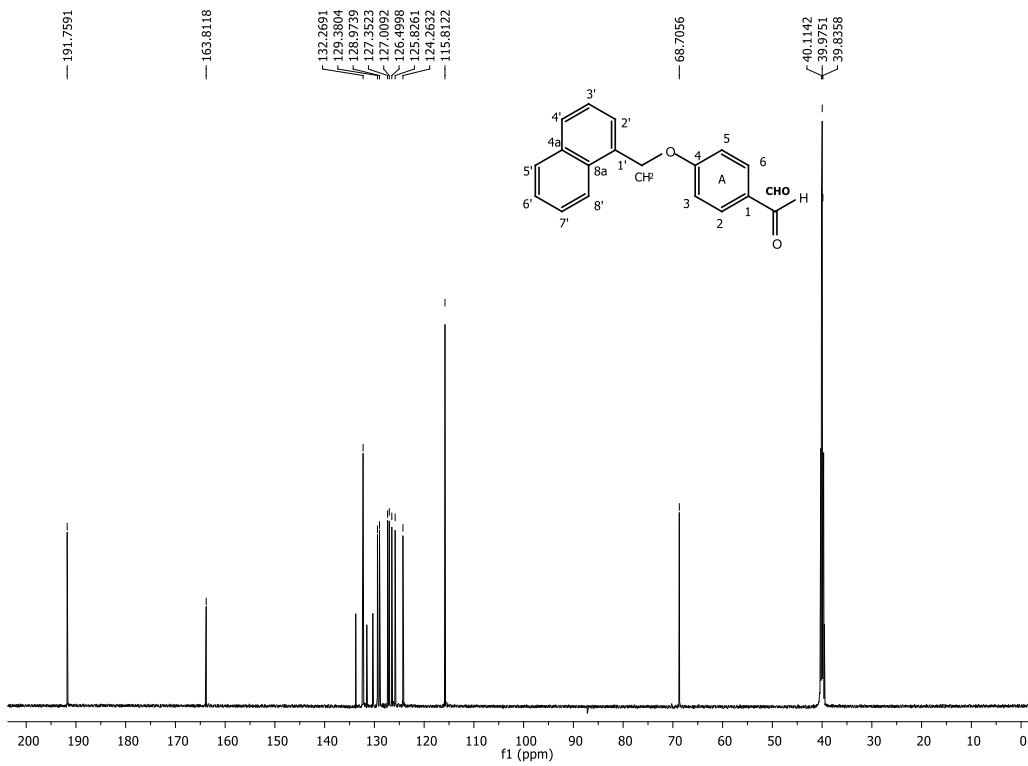
Espectro 104. Patrón de fragmentación del compuesto 12 modalidad IE



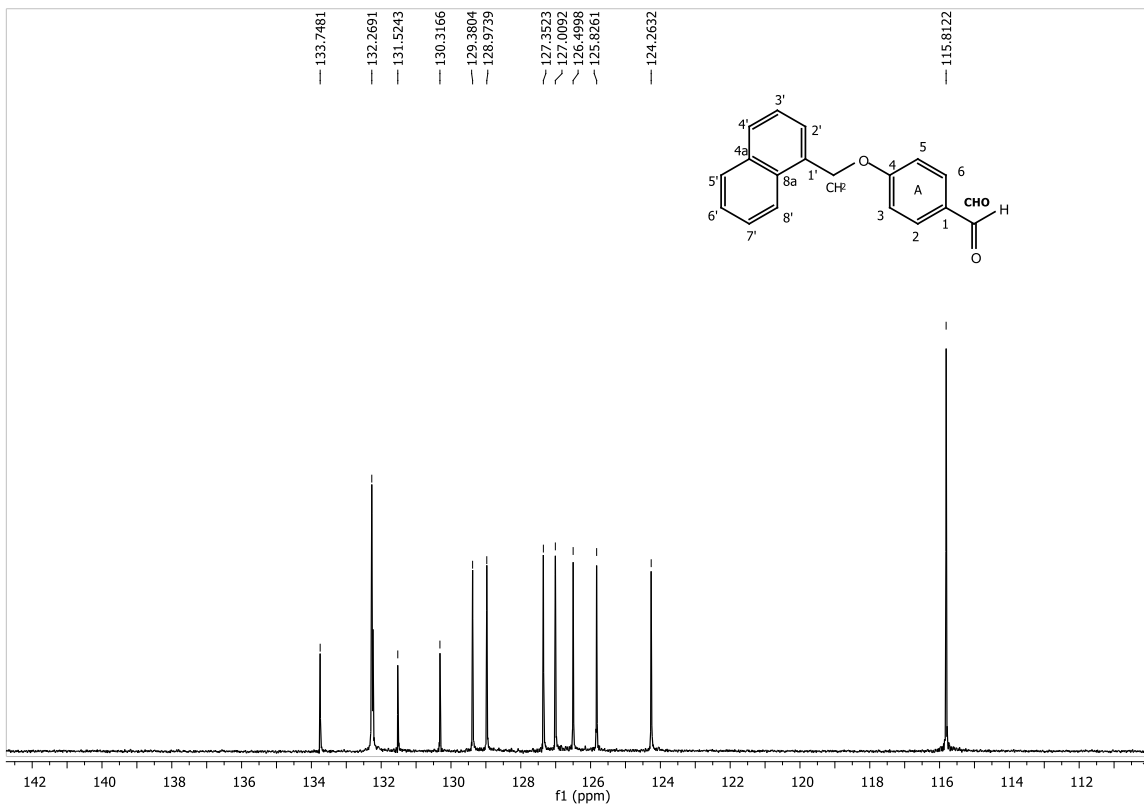
Espectro 105. Espectro RMN ¹H compuesto 12



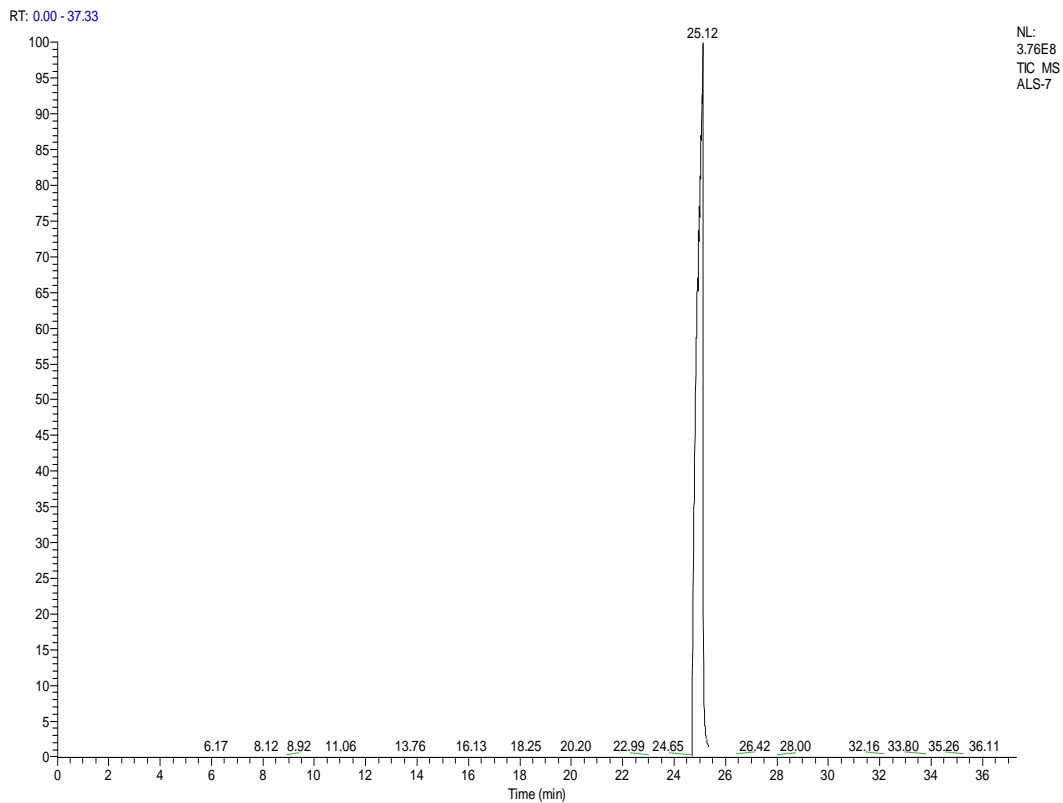
Espectro 106. Espectro RMN ¹H zona aromática compuesto 12



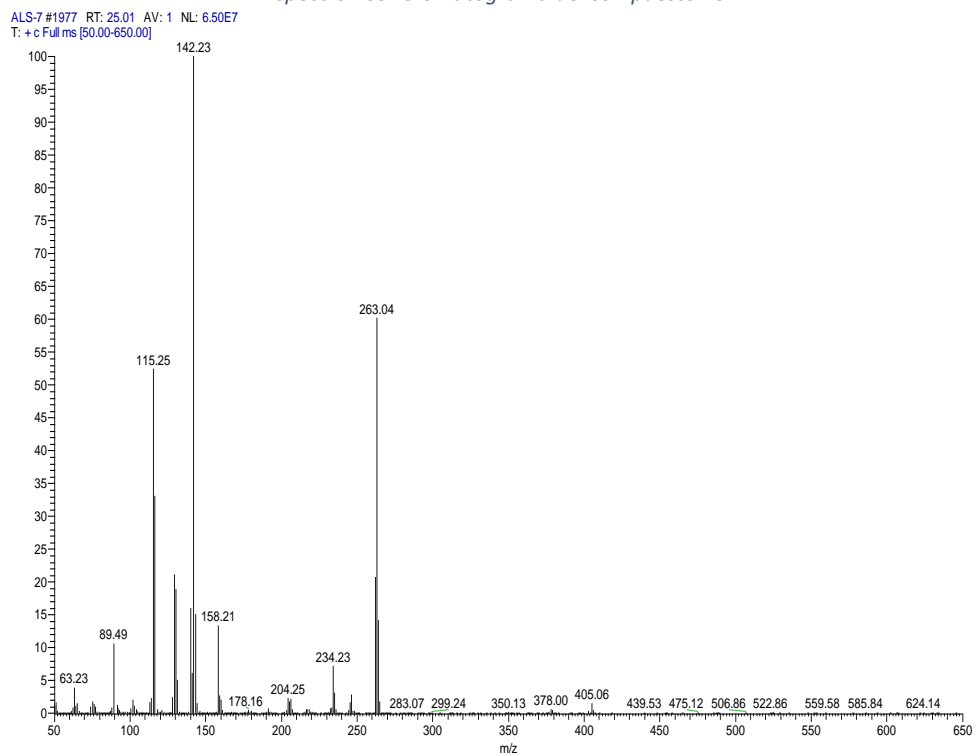
Espectro 107. Espectro RMN ^{13}C compuesto 12



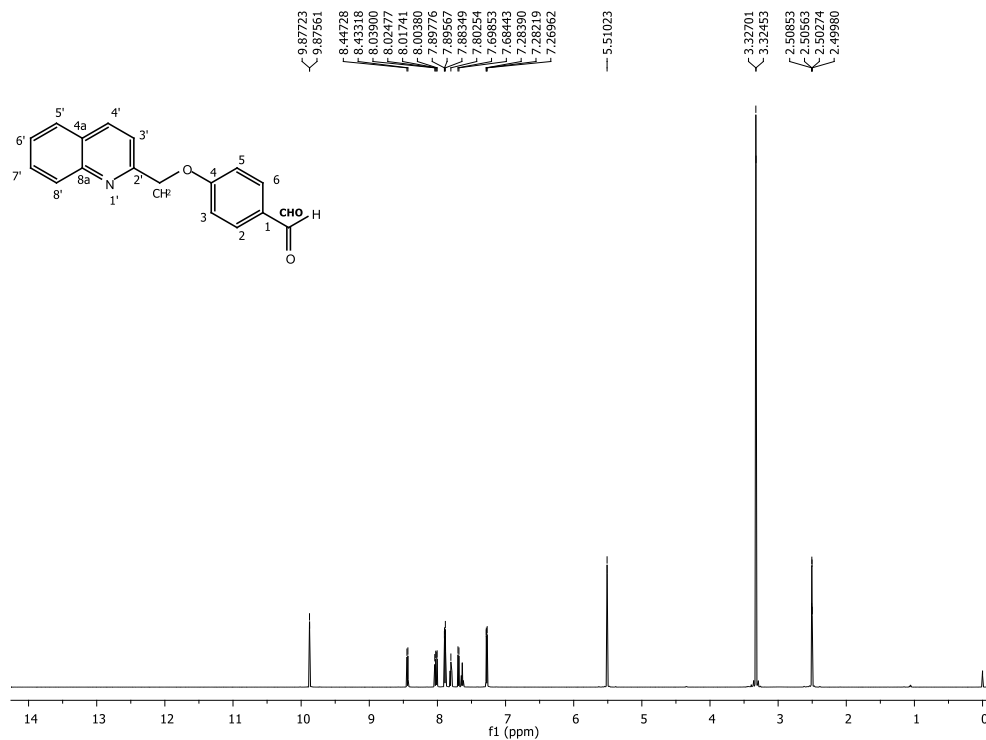
Espectro 108. Espectro RMN ^{13}C zona aromática compuesto 12



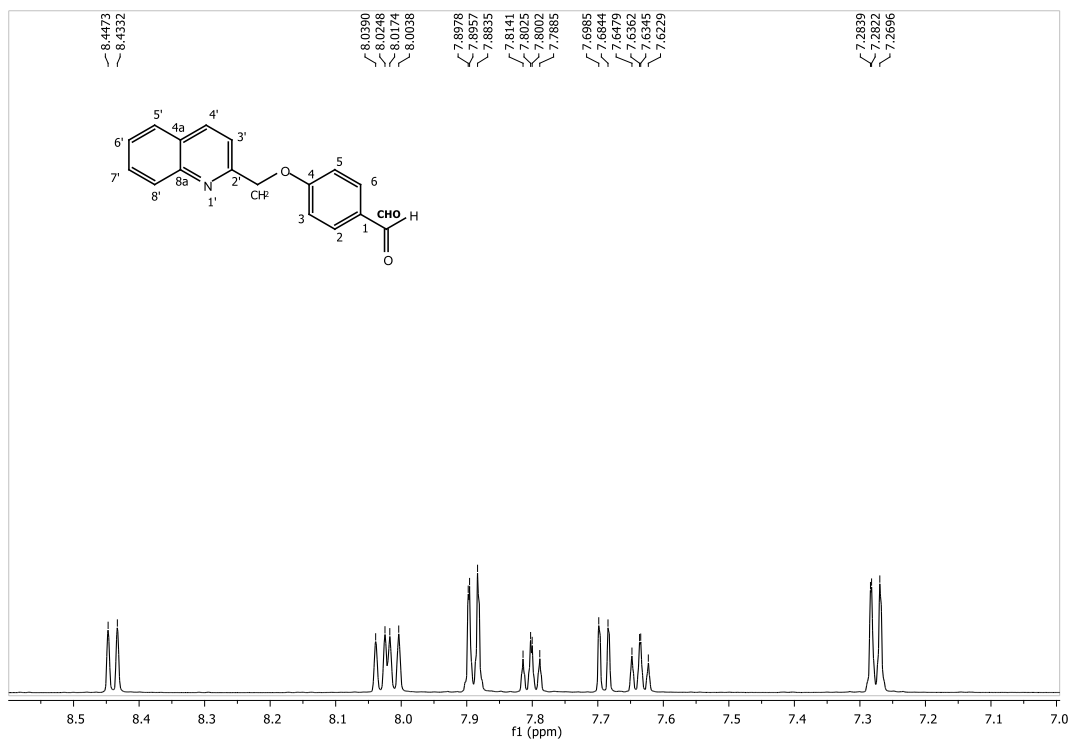
Espectro 109. Cromatograma del compuesto **13**



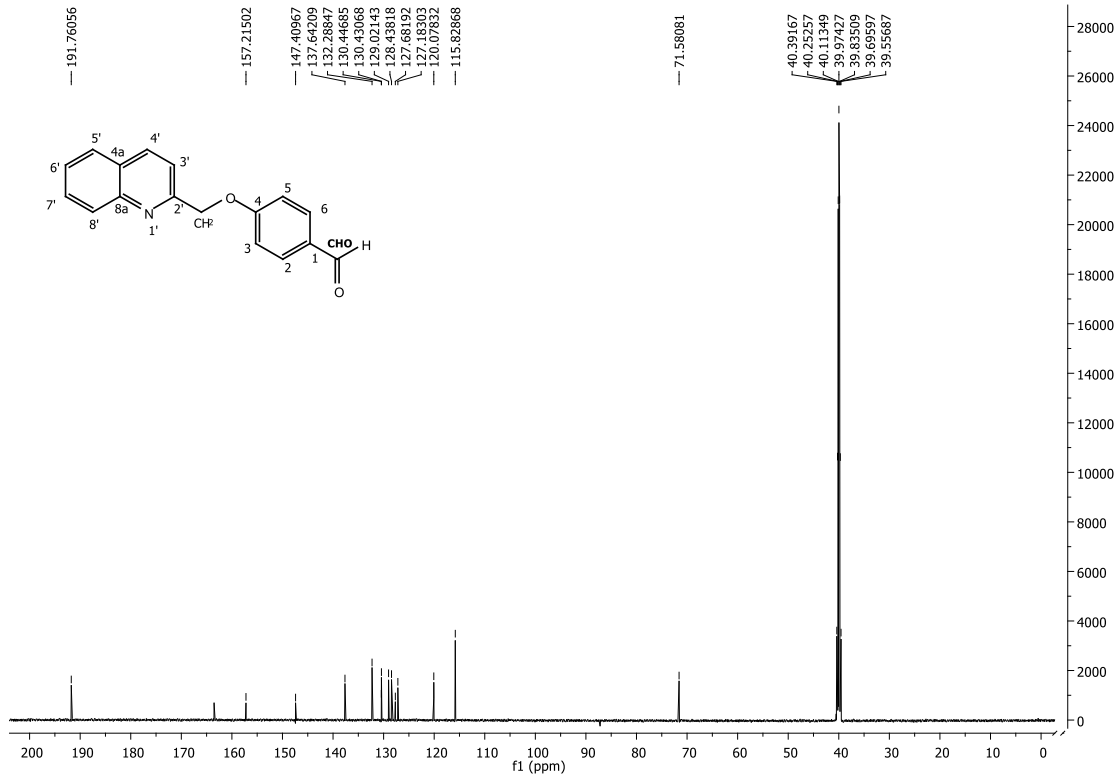
Espectro 110. Patrón de fragmentación del compuesto **13** modalidad IE



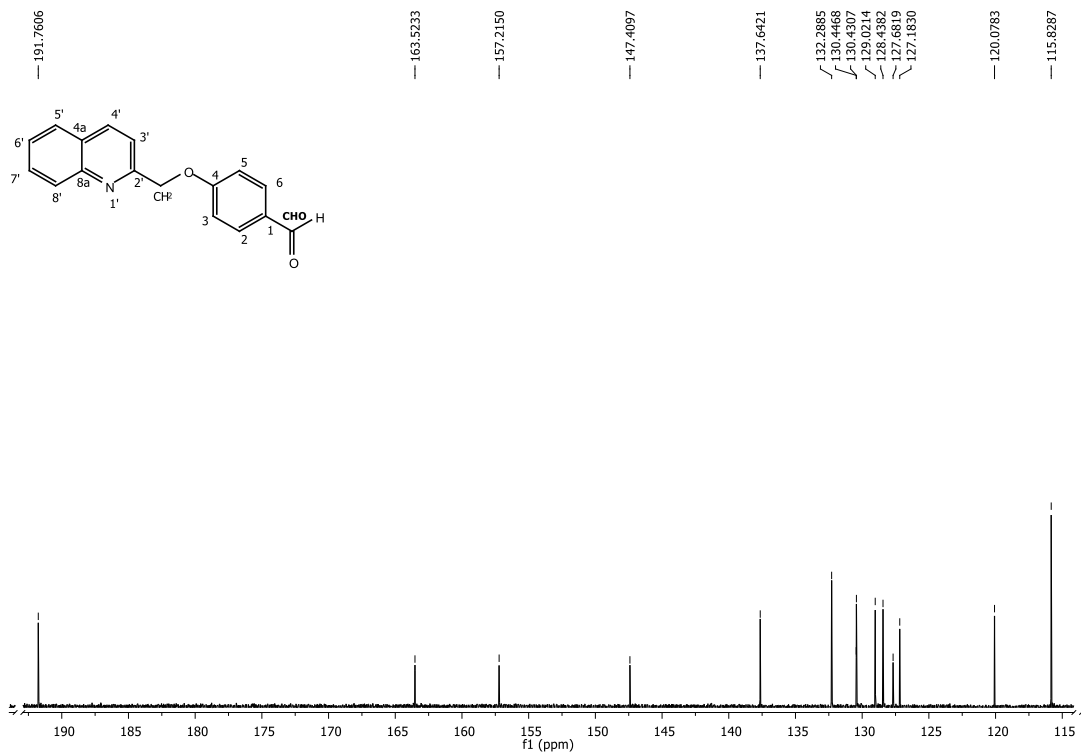
Espectro 111. Espectro RMN ¹H compuesto 13



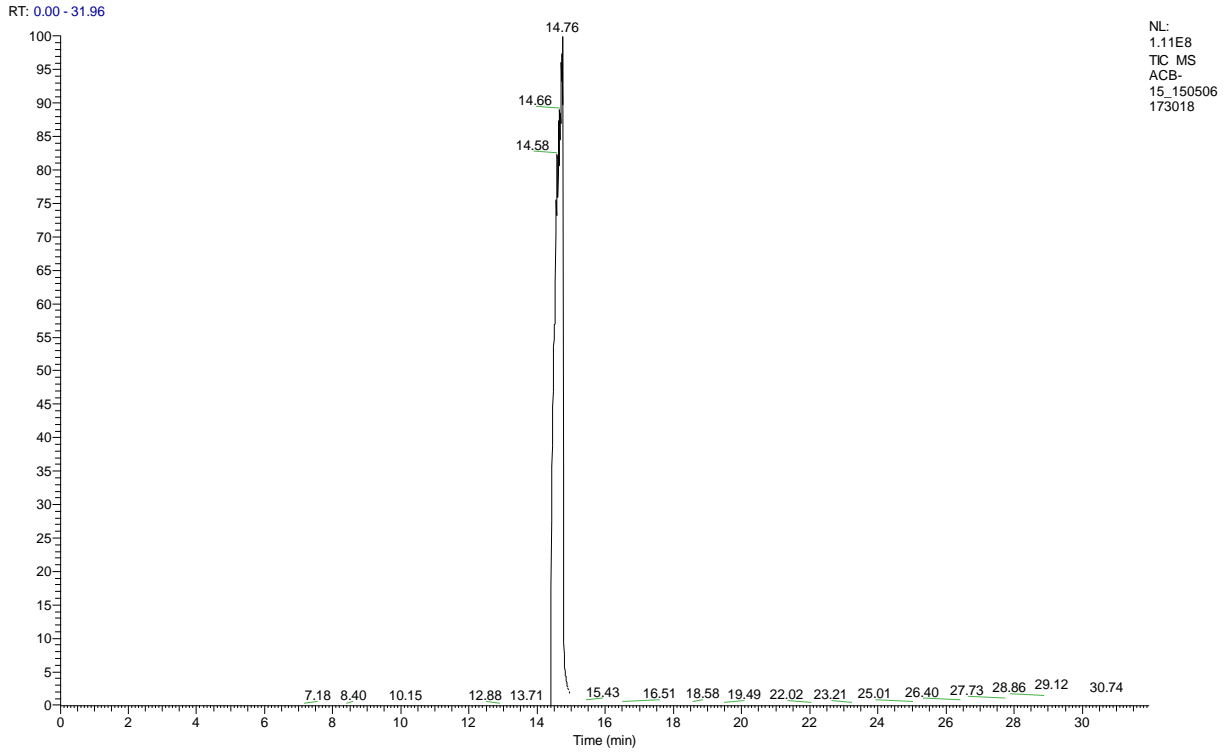
Espectro 112. Espectro RMN ¹H zona aromática compuesto 13



Espectro 113. Espectro RMN ¹³C compuesto 13

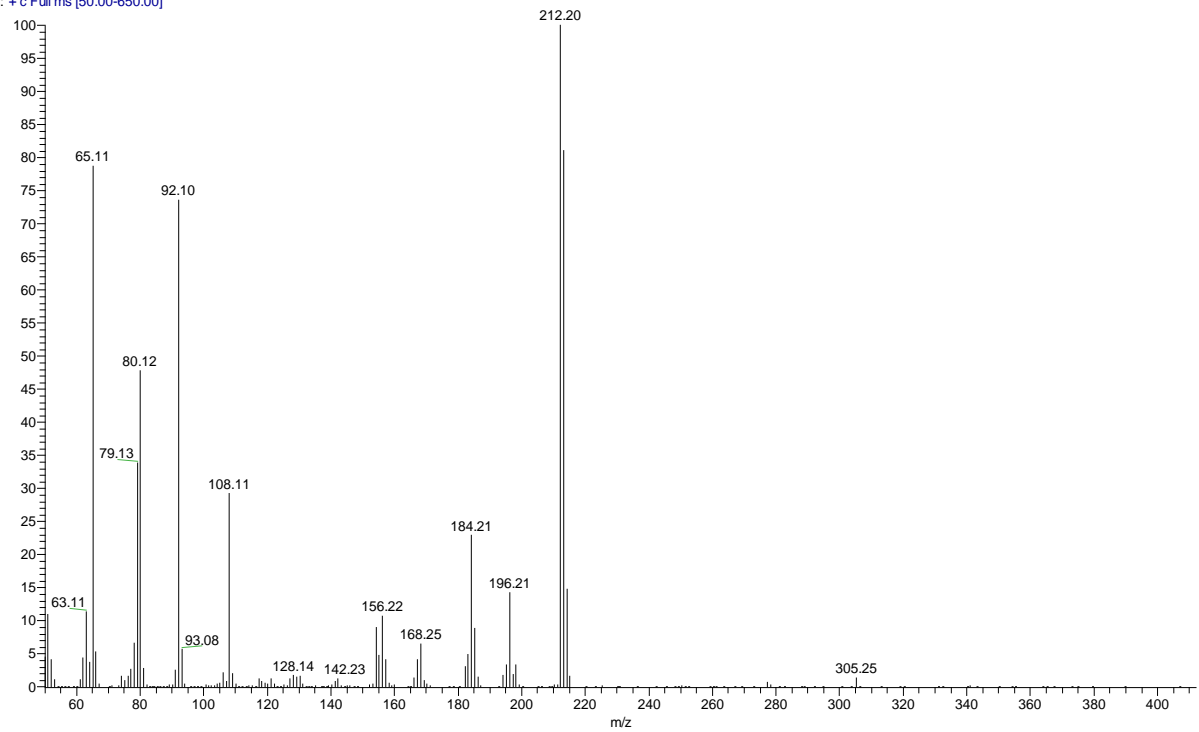


Espectro 114. Espectro RMN ¹³C zona aromática compuesto 13

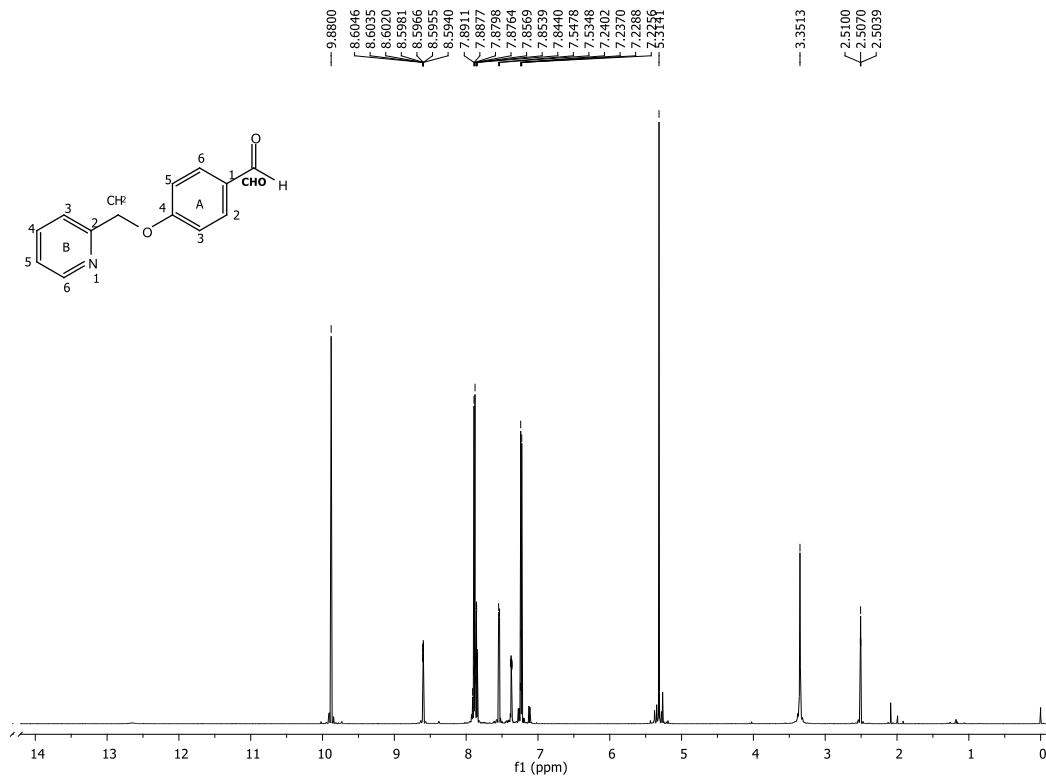


Espectro 115. Cromatograma compuesto 14

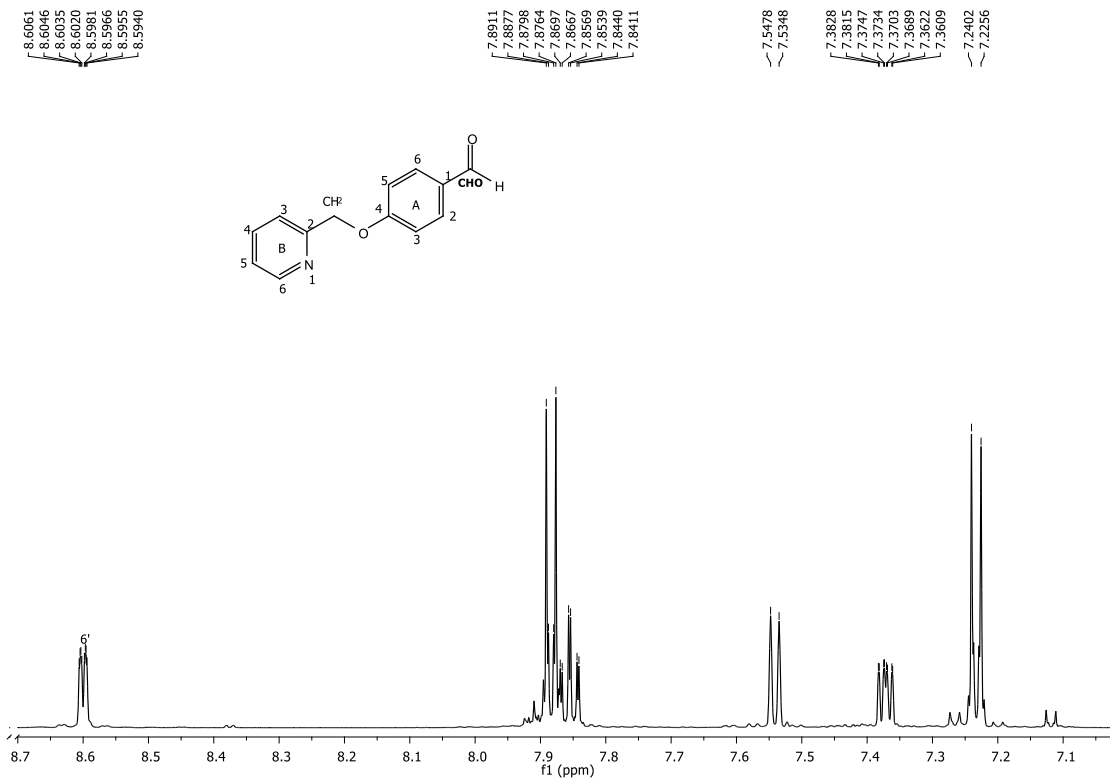
ACB-15_150506173018 #764 RT: 14.63 AV: 1 NL: 1.43E7
T: + c Full ms [50.00-650.00]



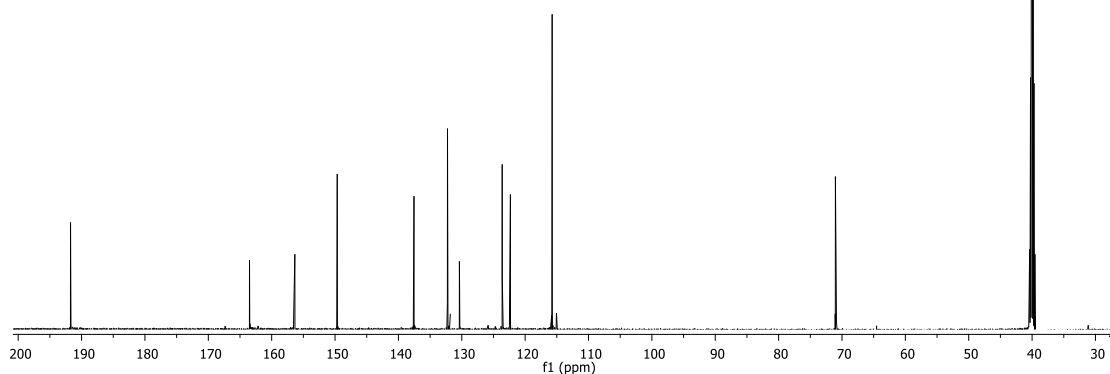
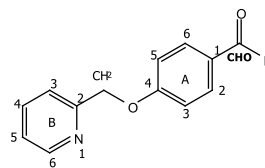
Espectro 116. Patrón de fragnemtación del compuesto 14 modalidad IE



Espectro 117. Espectro RMN ¹H compuesto 14

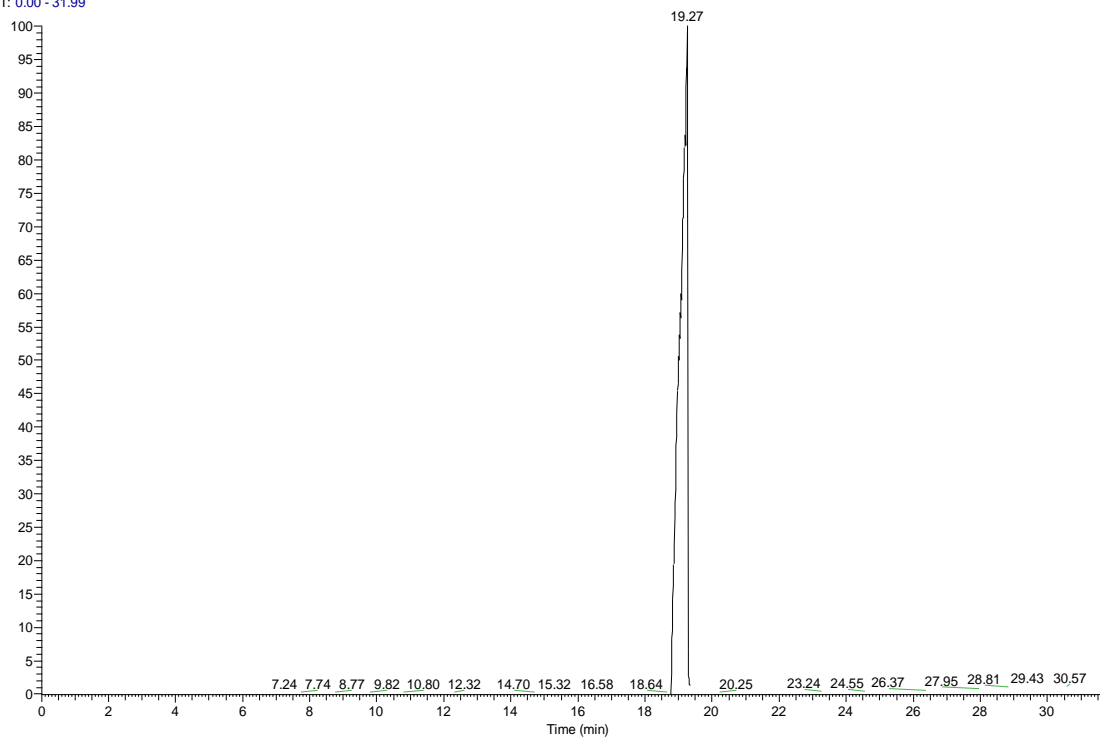


Espectro 118. Espectro RMN ¹H zona aromática compuesto 14



Espectro 119. Espectro RMN ¹³C compuesto 14

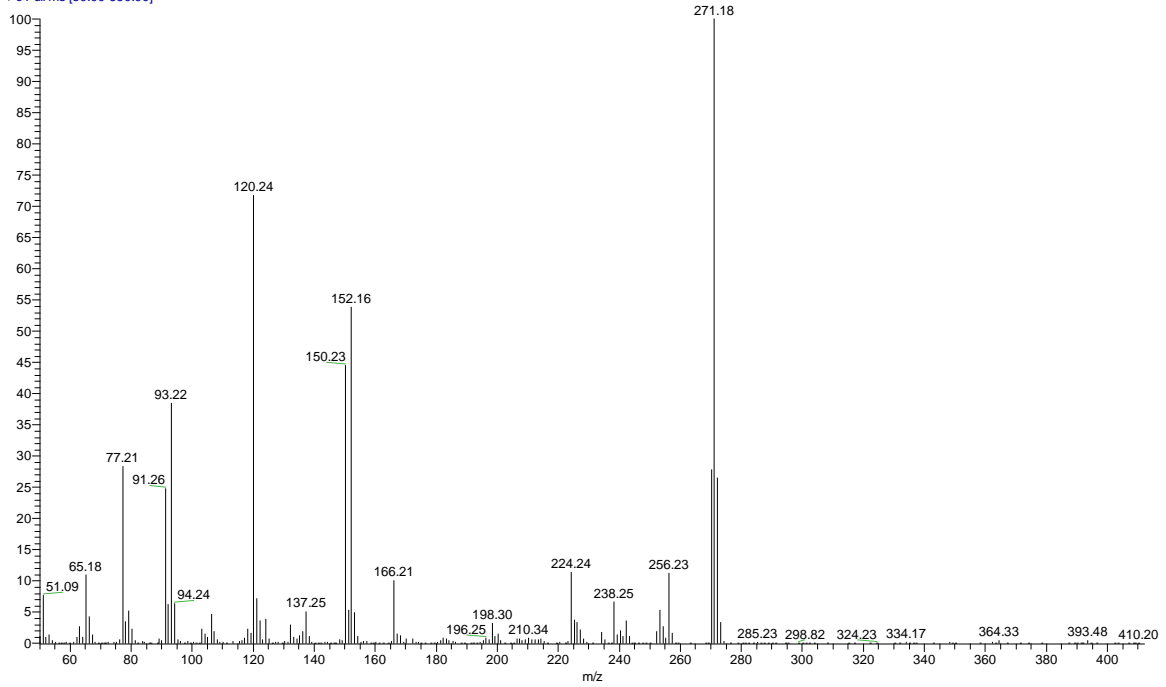
RT: 0.00 - 31.99



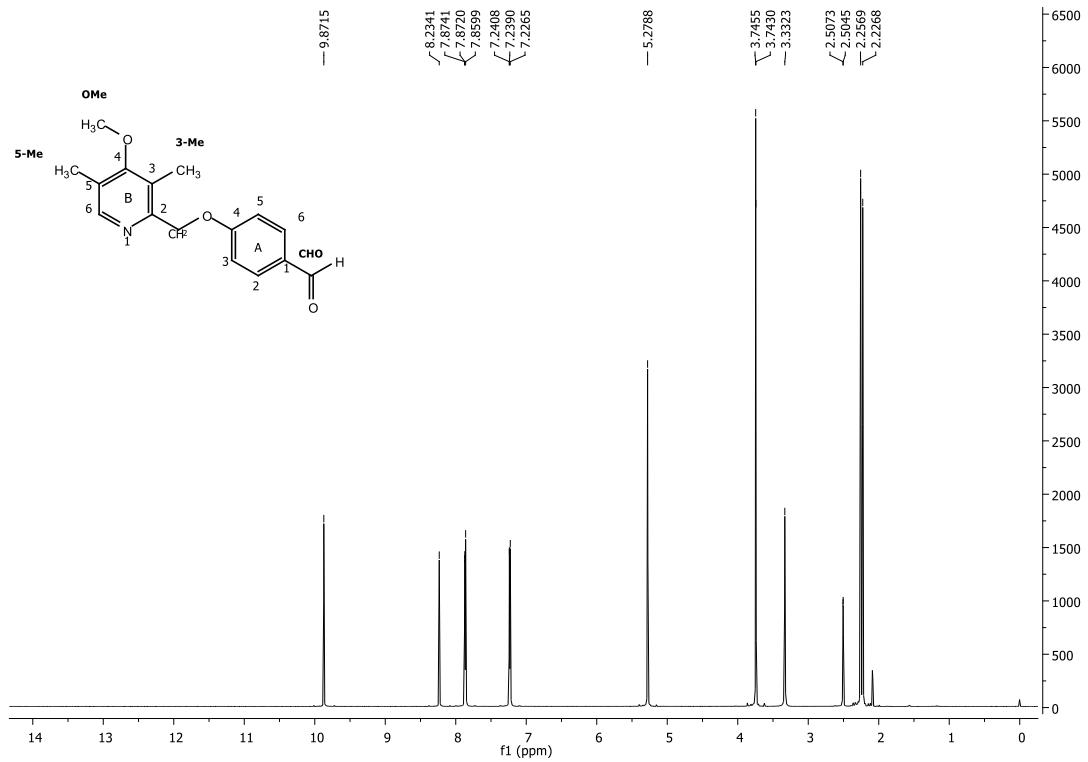
NL:
3.04E8
TIC MS
ACB-16

Espectro 120. Cromatograma compuesto 15

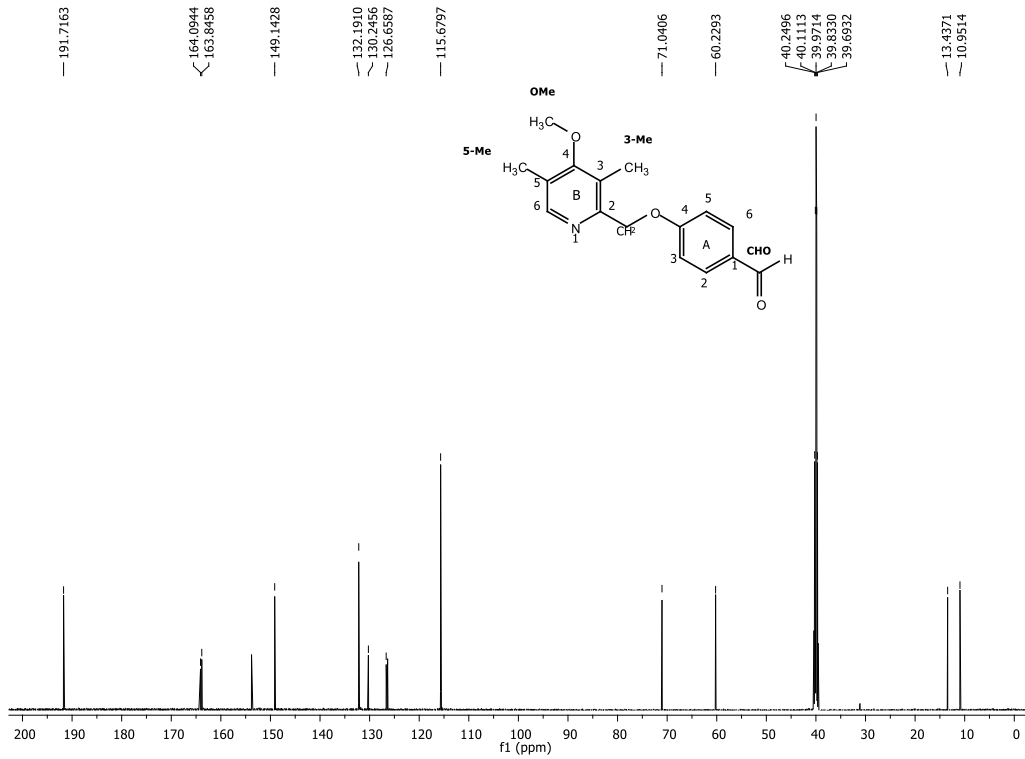
ACB-16 #1211 RT: 19.10 AV: 1 NL: 2.95E7
T: + c Full ms [50.00-650.00]



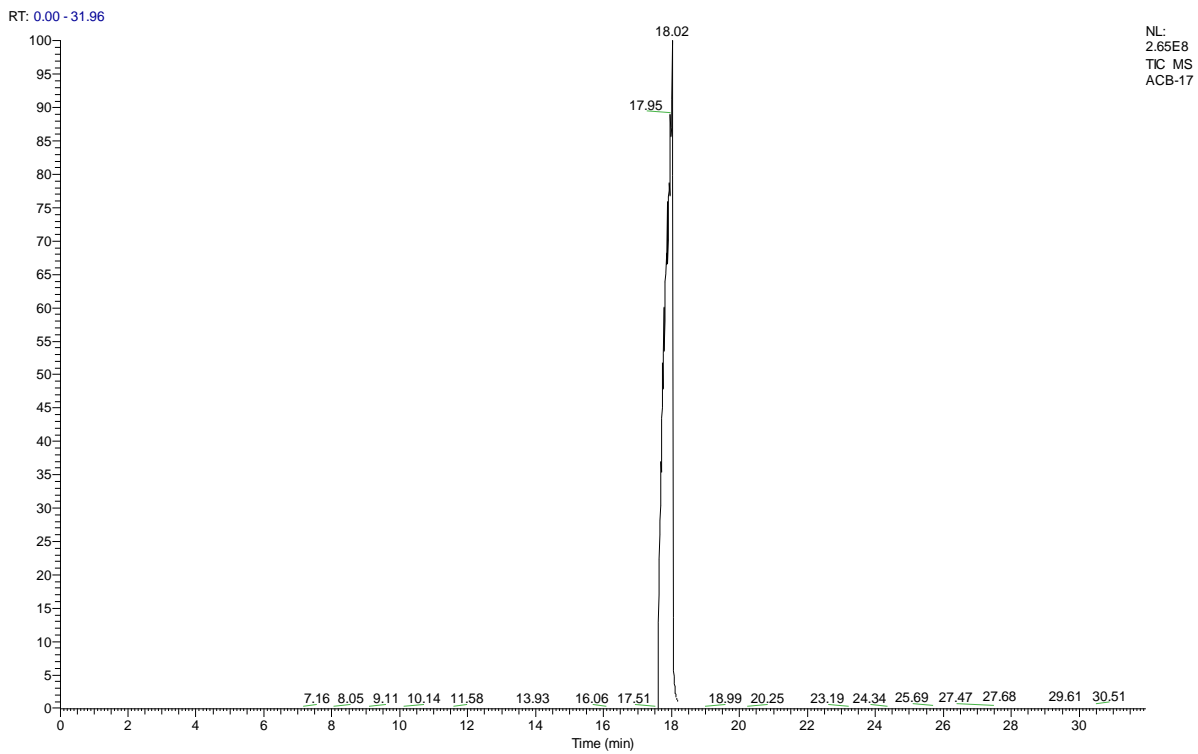
Espectro 121. Patrón de fragmentación del compuesto 15 modalidad IE



Espectro 122. Espectro RMN ¹H compuesto 15



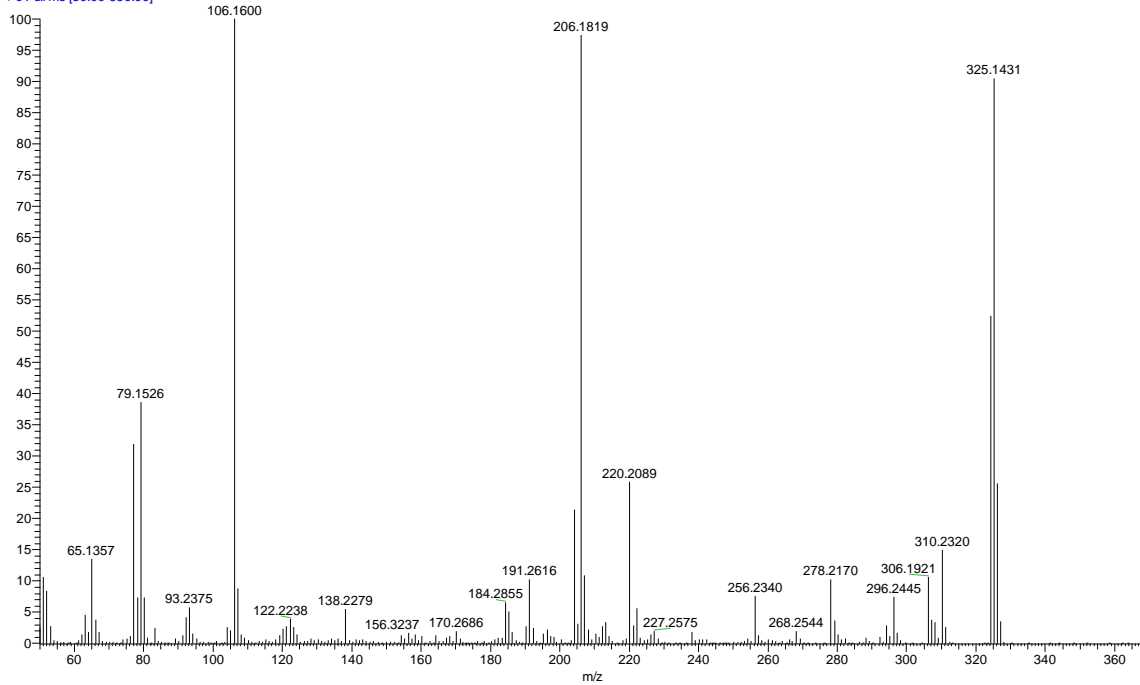
Espectro 123. Espectro RMN ¹³C zona aromática compuesto 15



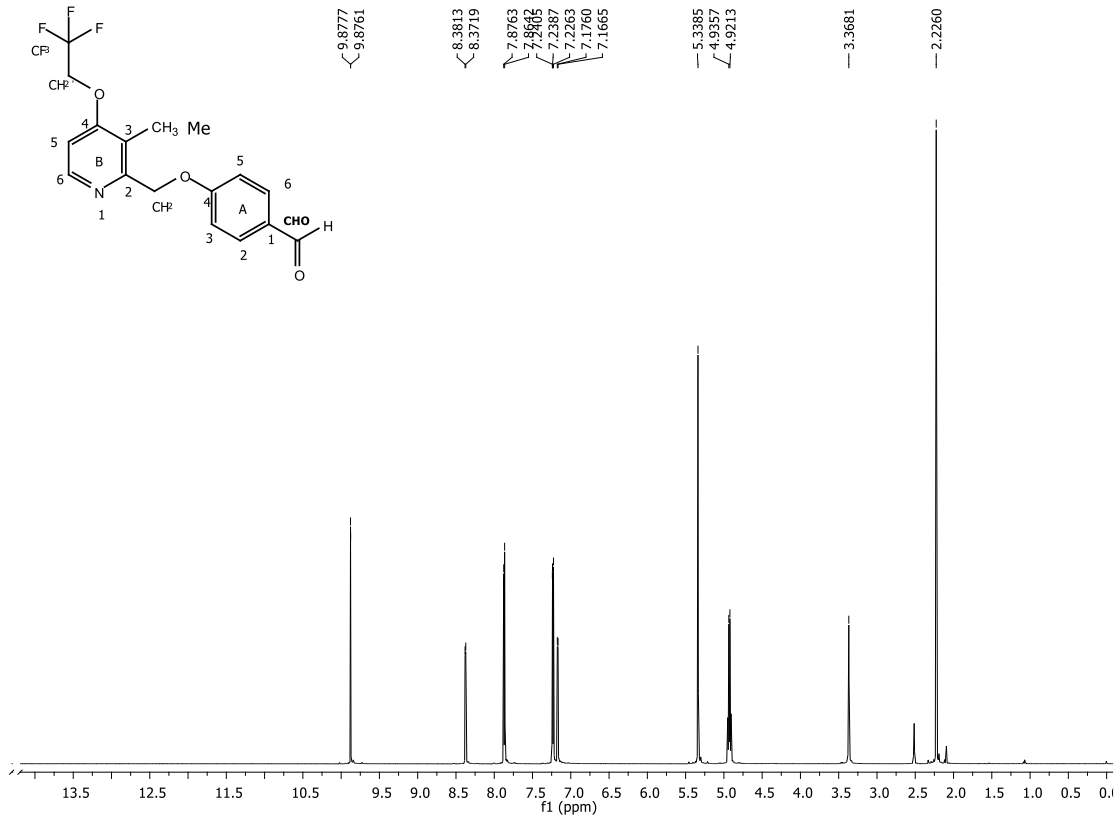
NL:
2.65E8
TIC MS
ACB-17

Espectro 124. Cromatograma compuesto 16

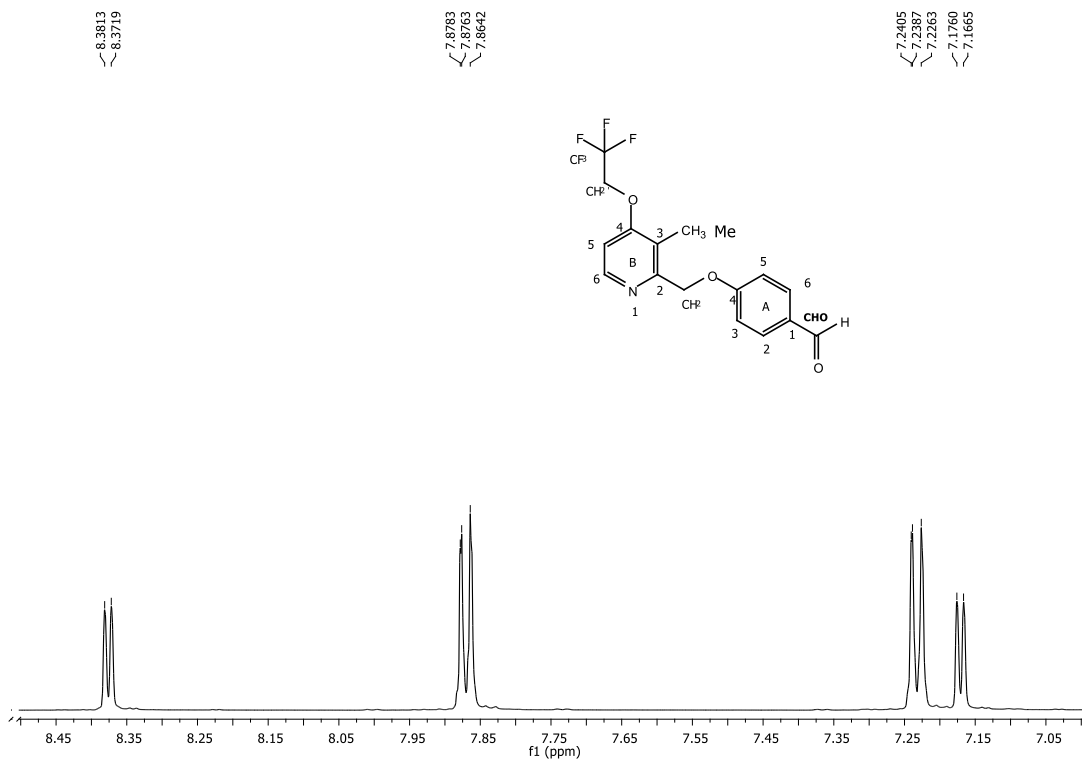
ACB-17 #1083 RT: 17.92 AV: 1 NL: 2.51E7
T: + c Full ms [50.00-650.00]



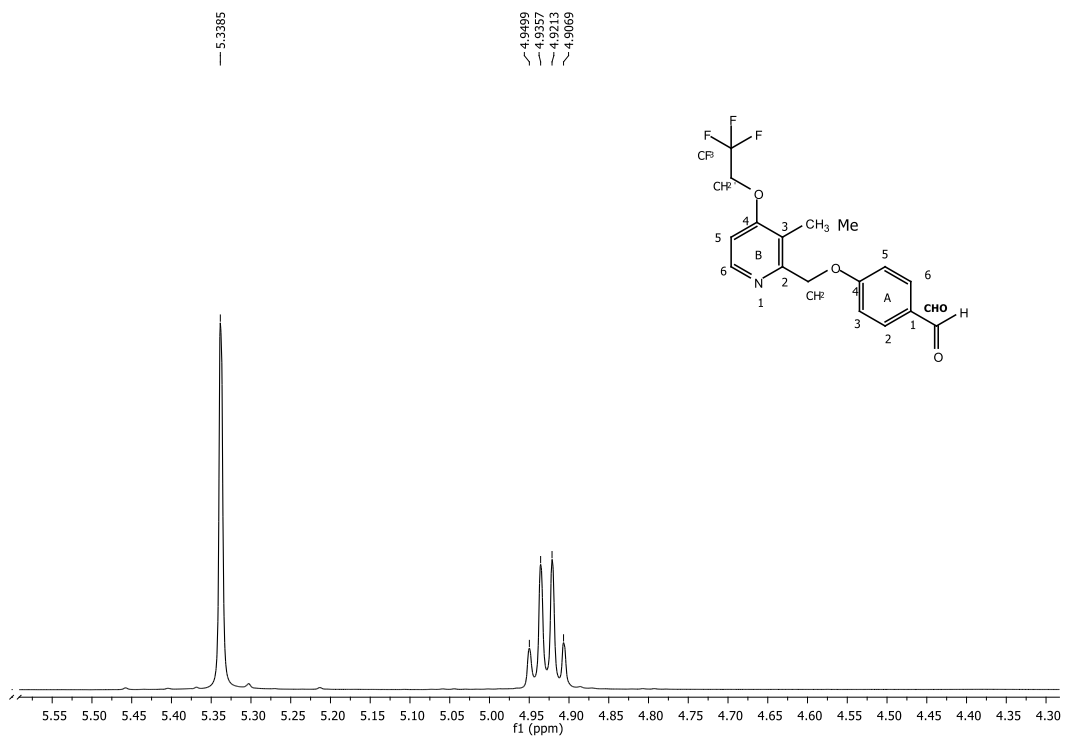
Espectro 125. Patrón de fragmentación del compuesto 16 modalidad IE



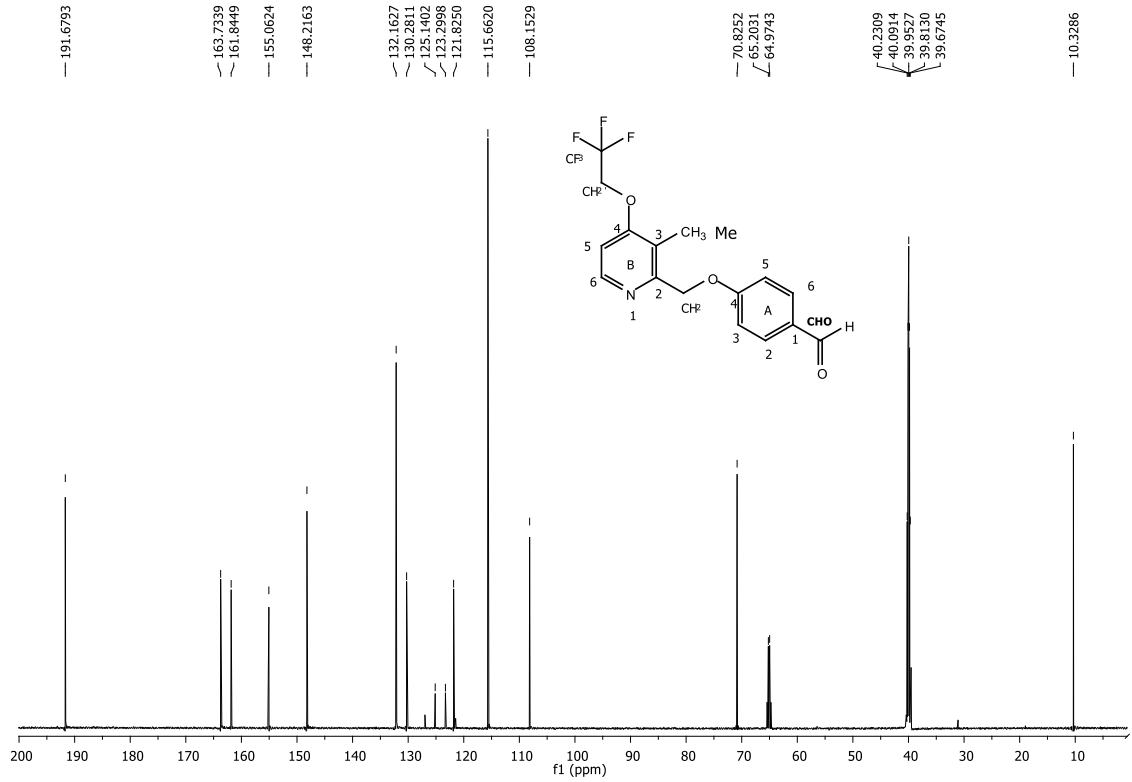
Espectro 126. Espectro RMN ¹H compuesto 16



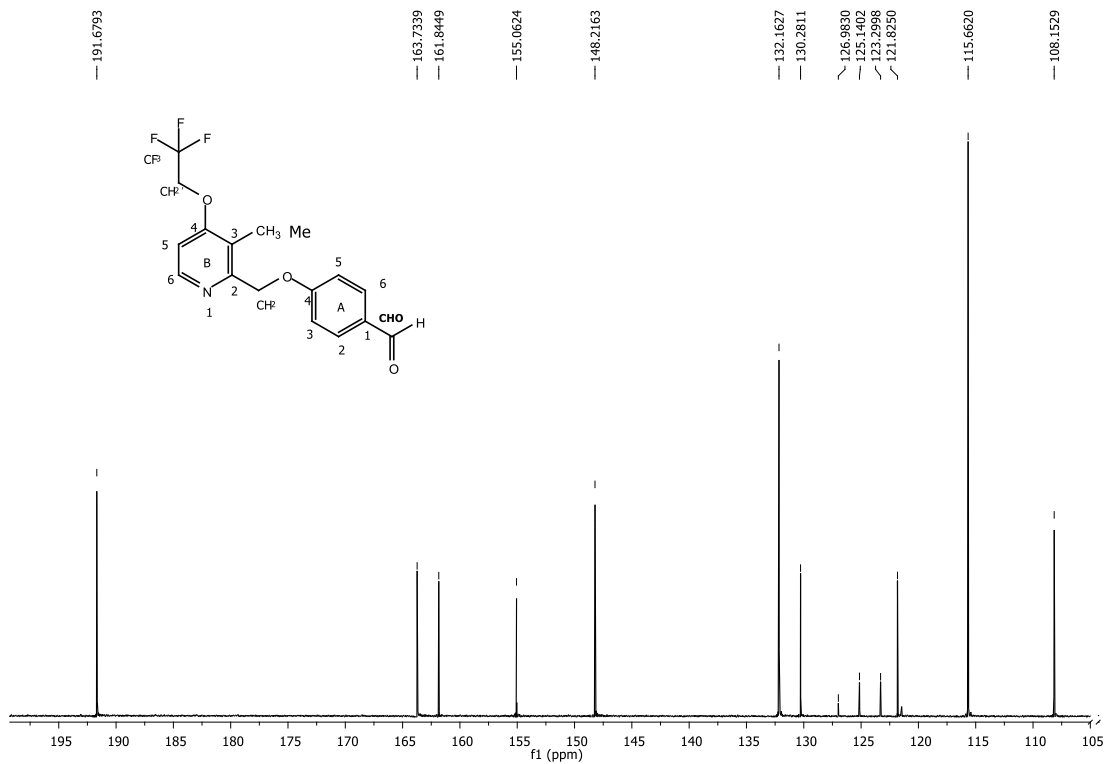
Espectro 127. Espectro RMN ¹H zona aromática compuesto 16



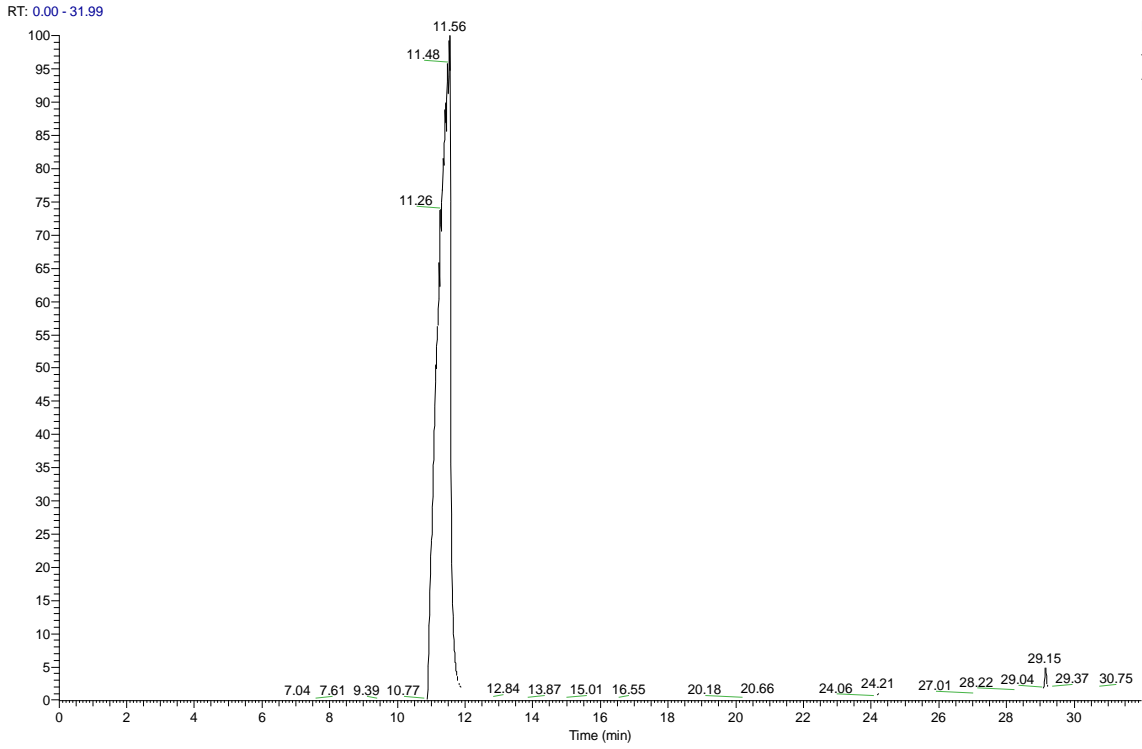
Espectro 128. Espectro RMN ¹H zona alifática compuesto 16



Espectro 129. Espectro RMN ¹³C compuesto 16

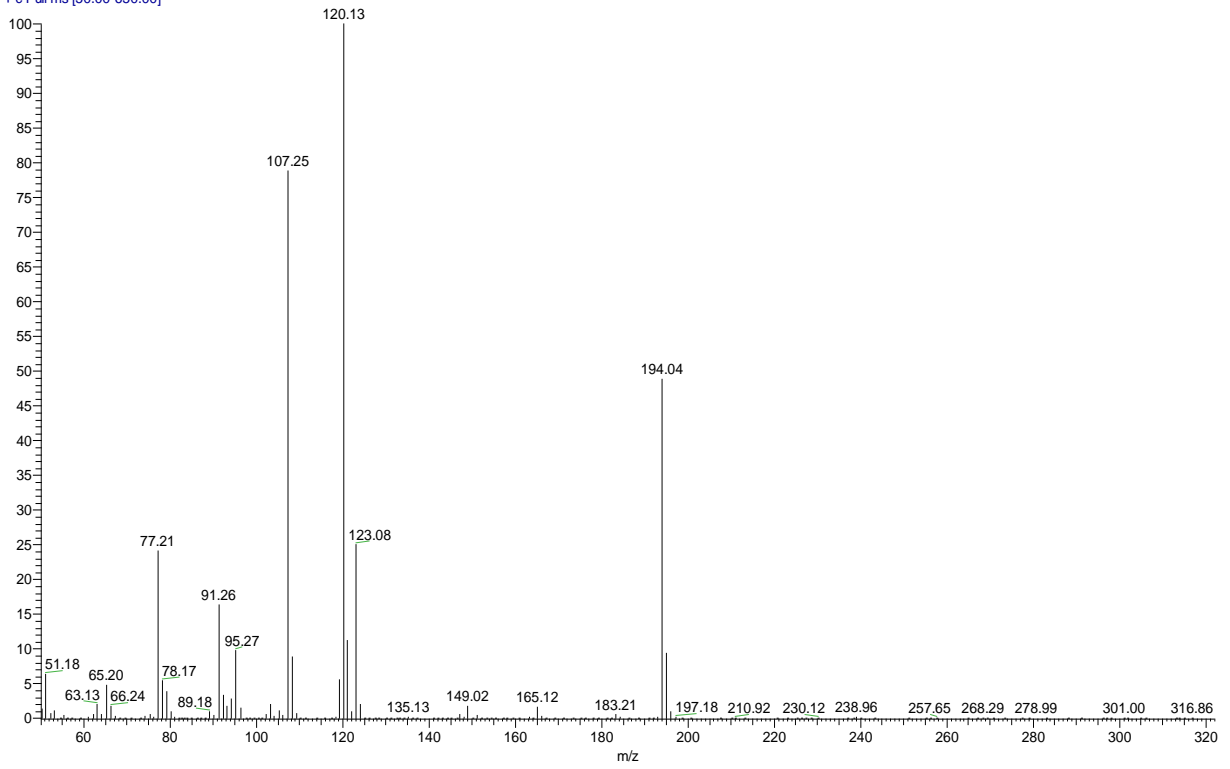


Espectro 130. Espectro RMN ¹³C zona aromática compuesto 16

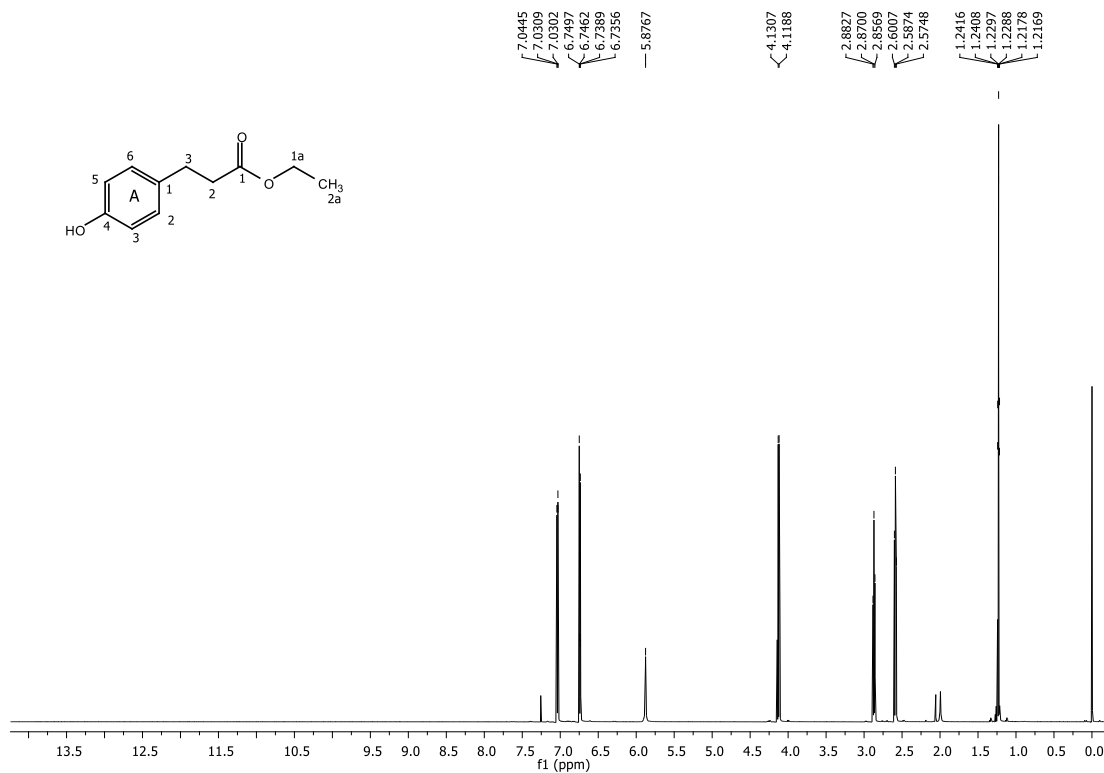


Espectro 131. Cromatograma compuesto 17

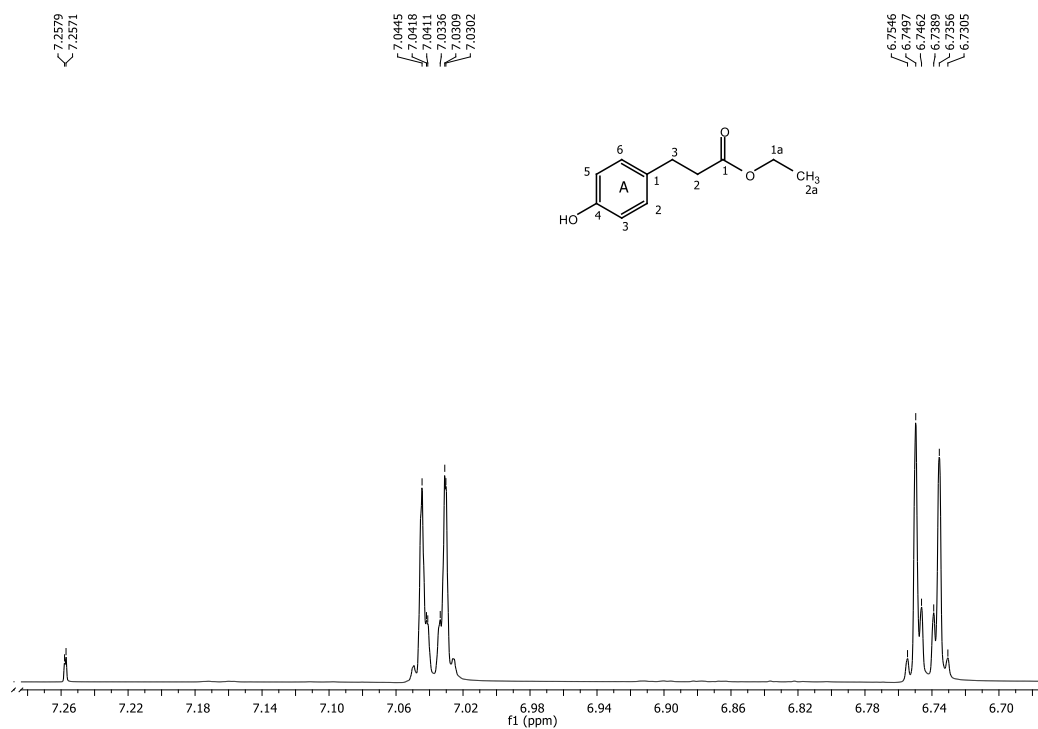
ACB-18 #456 RT: 11.47 AV: 1 NL: 3.28E7
T: + c Full ms [50.00-650.00]



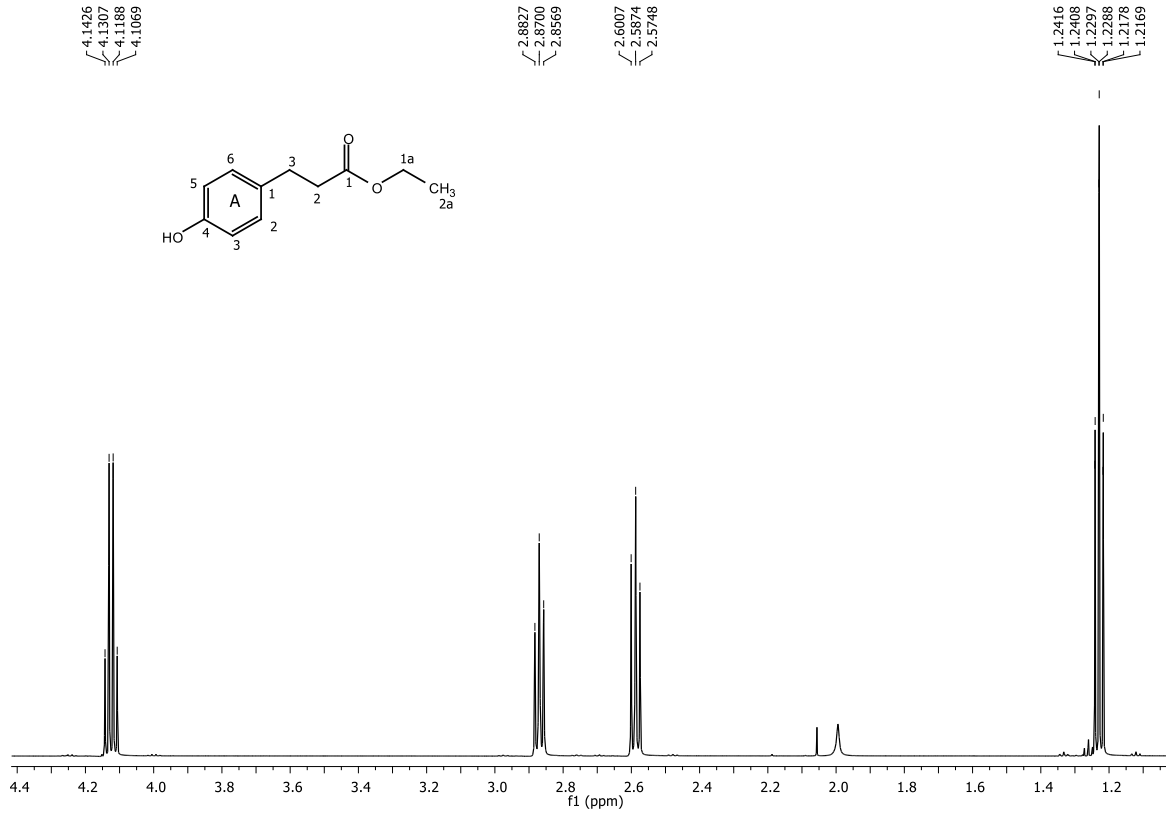
Espectro 132. Patrón de fragmentación del compuesto 17 modalidad IE



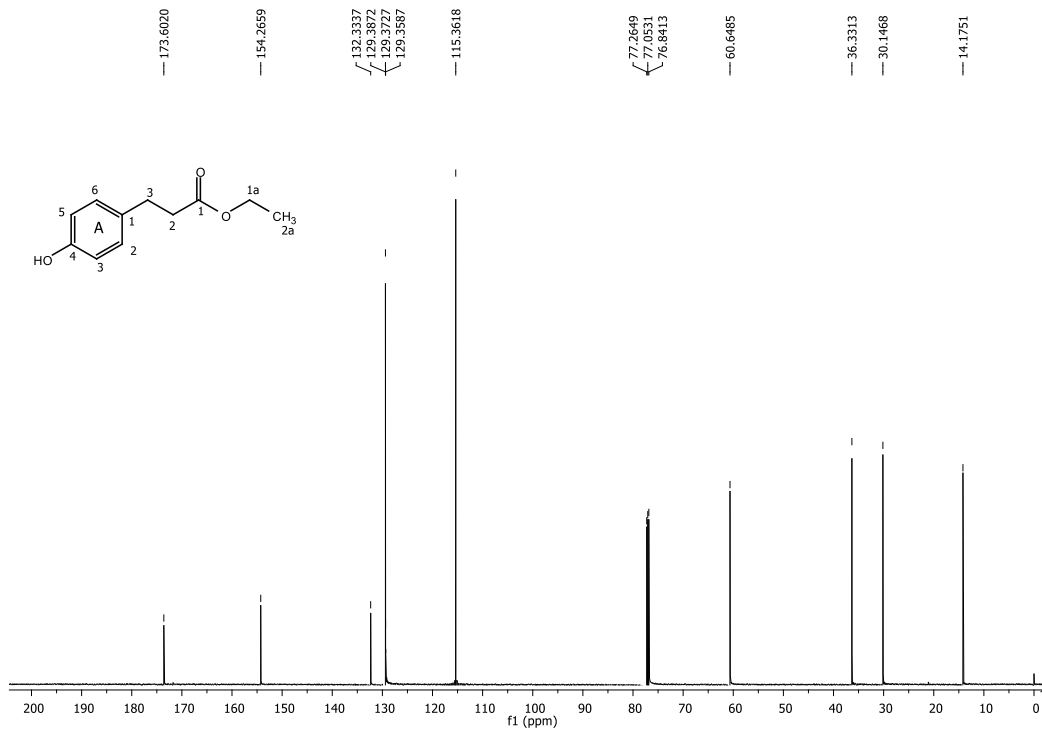
Espectro 133. Espectro RMN ¹H compuesto 17



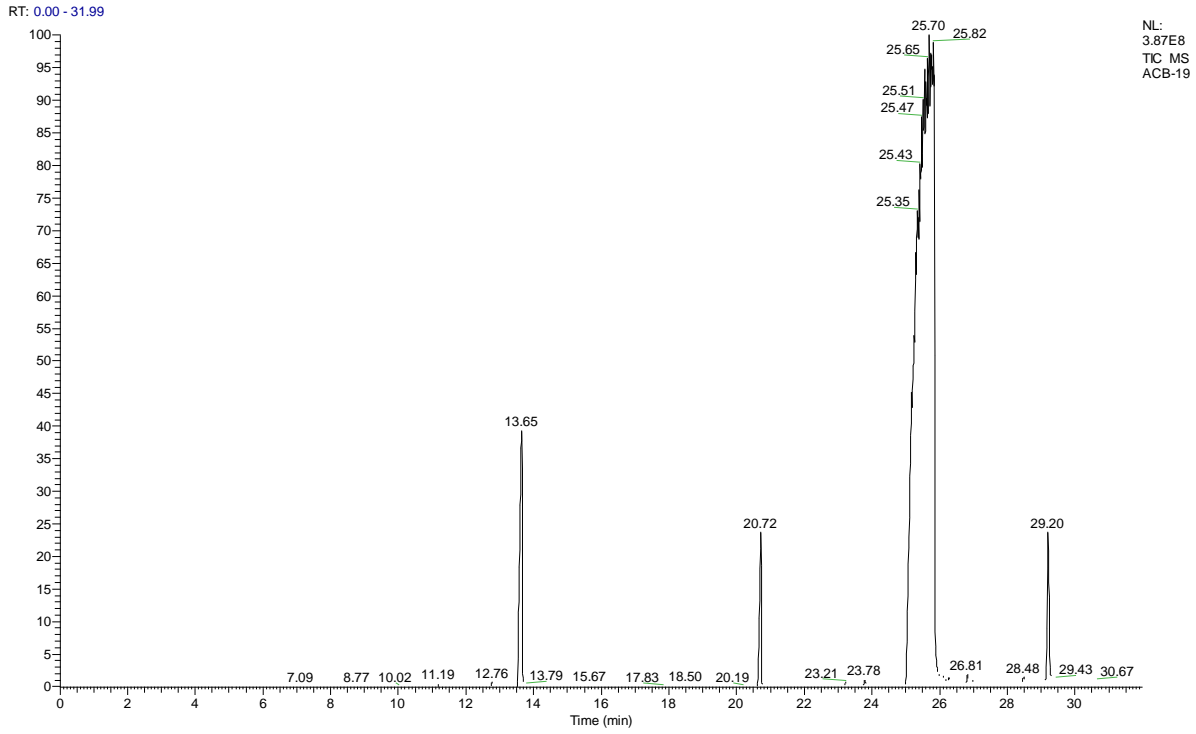
Espectro 134. Espectro RMN ¹H zona aromática compuesto 17



Espectro 135. Espectro RMN ¹H zona alifática compuesto 17

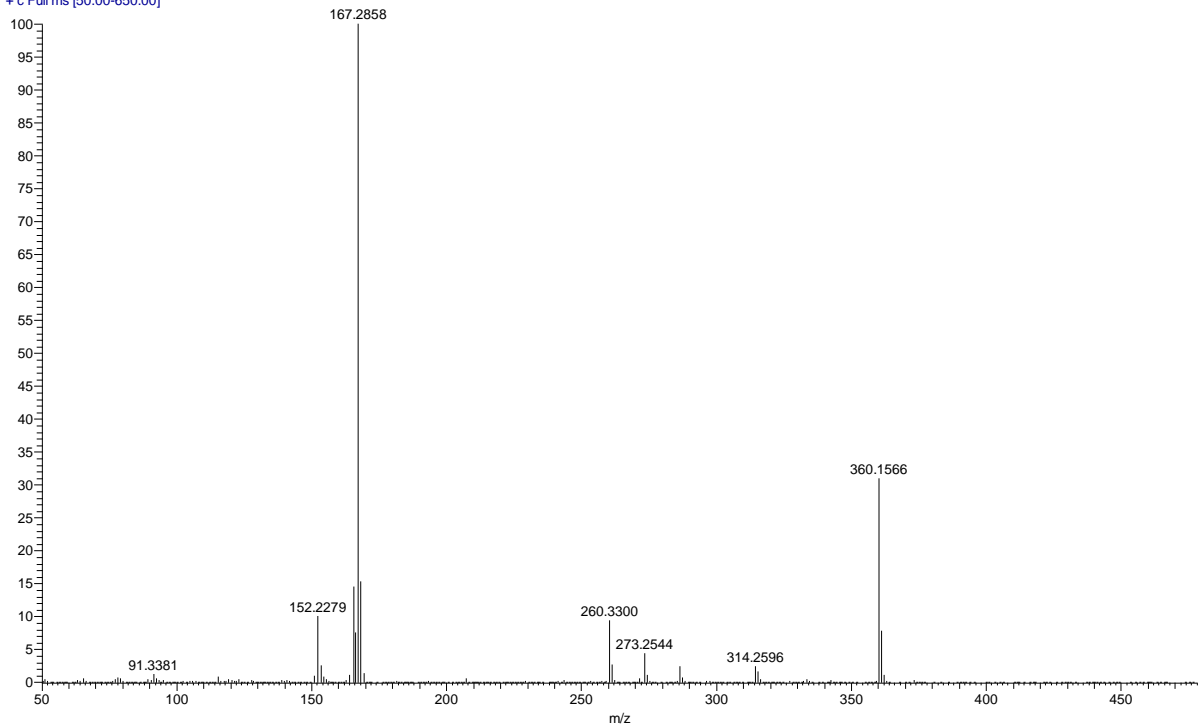


Espectro 136. Espectro RMN ¹³C compuesto 17

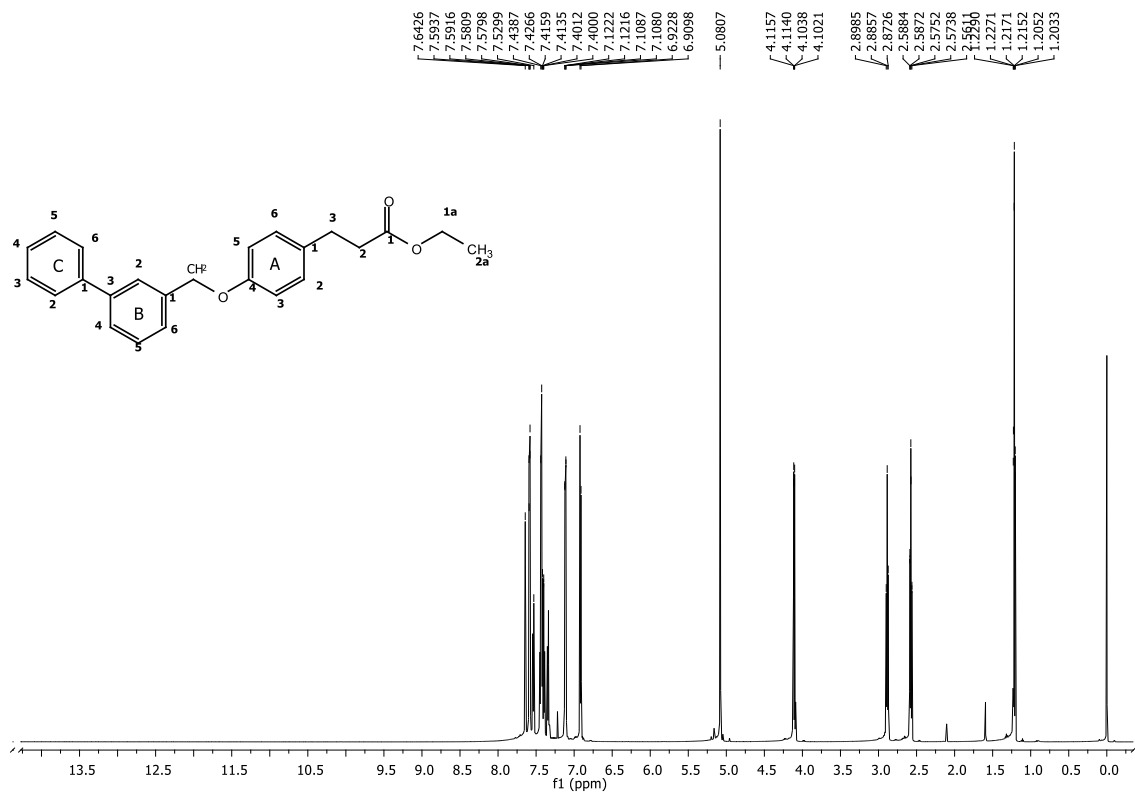


Espectro 137. Cromatograma del compuesto 18

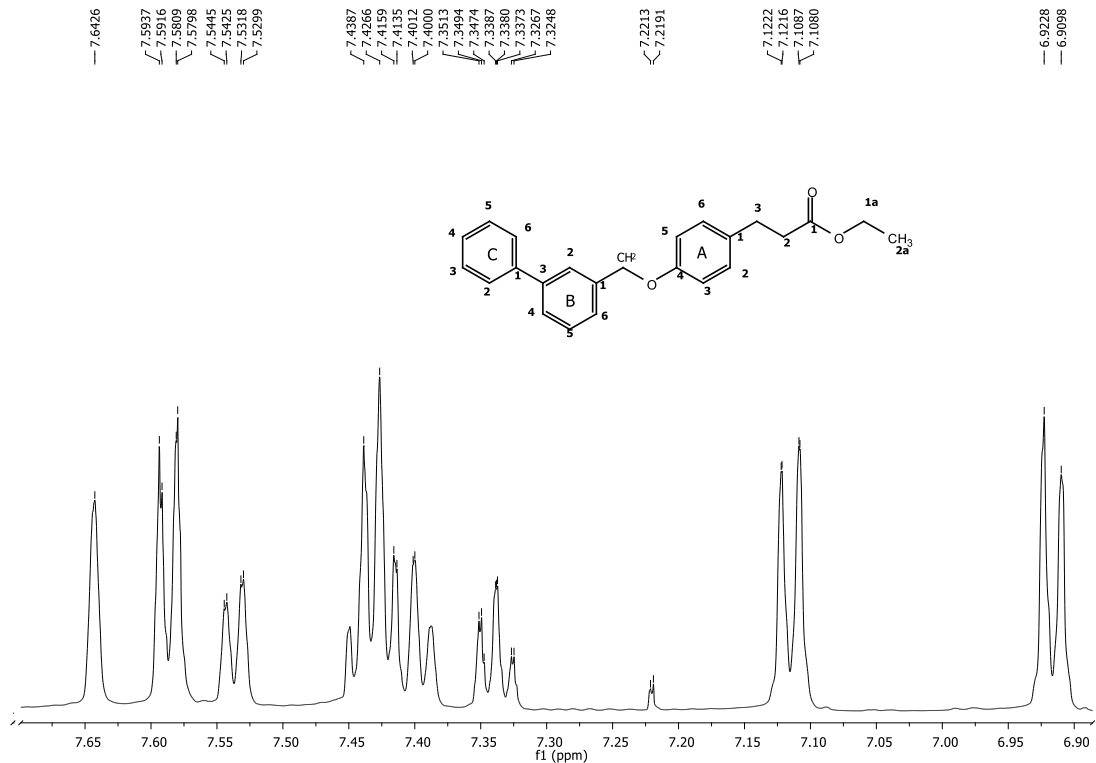
ACB-19 #1904 RT: 25.49 AV: 1 NL: 1.27E8
T: + c Full ms [50.00-650.00]



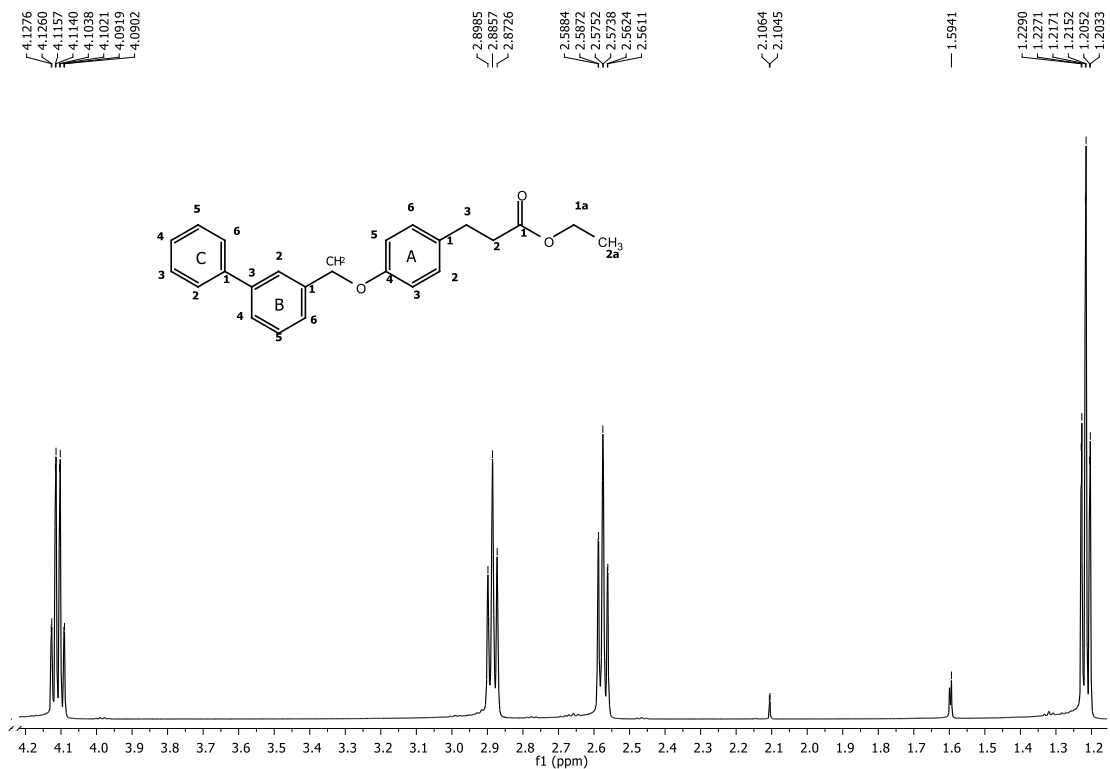
Espectro 138. Patrón de fragmentación del compuesto 18 modalidad IE



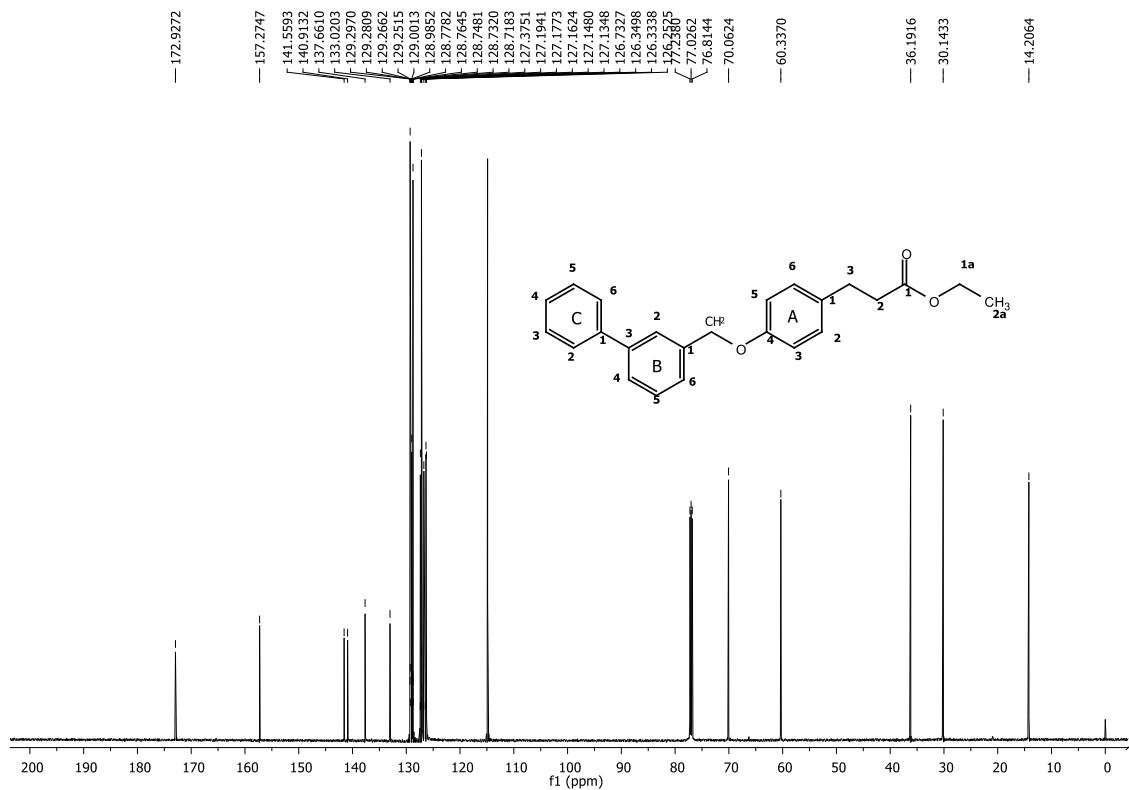
Espectro 139. Espectro RMN ¹H compuesto 18



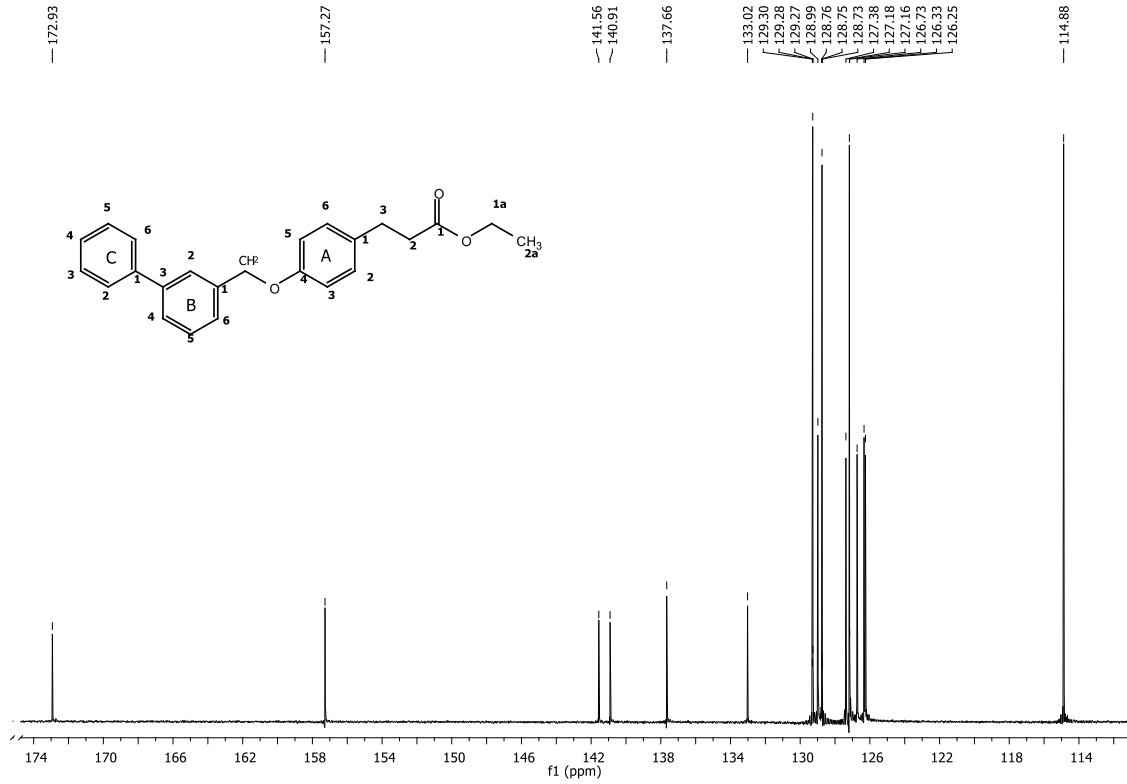
Espectro 140. Espectro RMN ¹H zona aromática compuesto 18



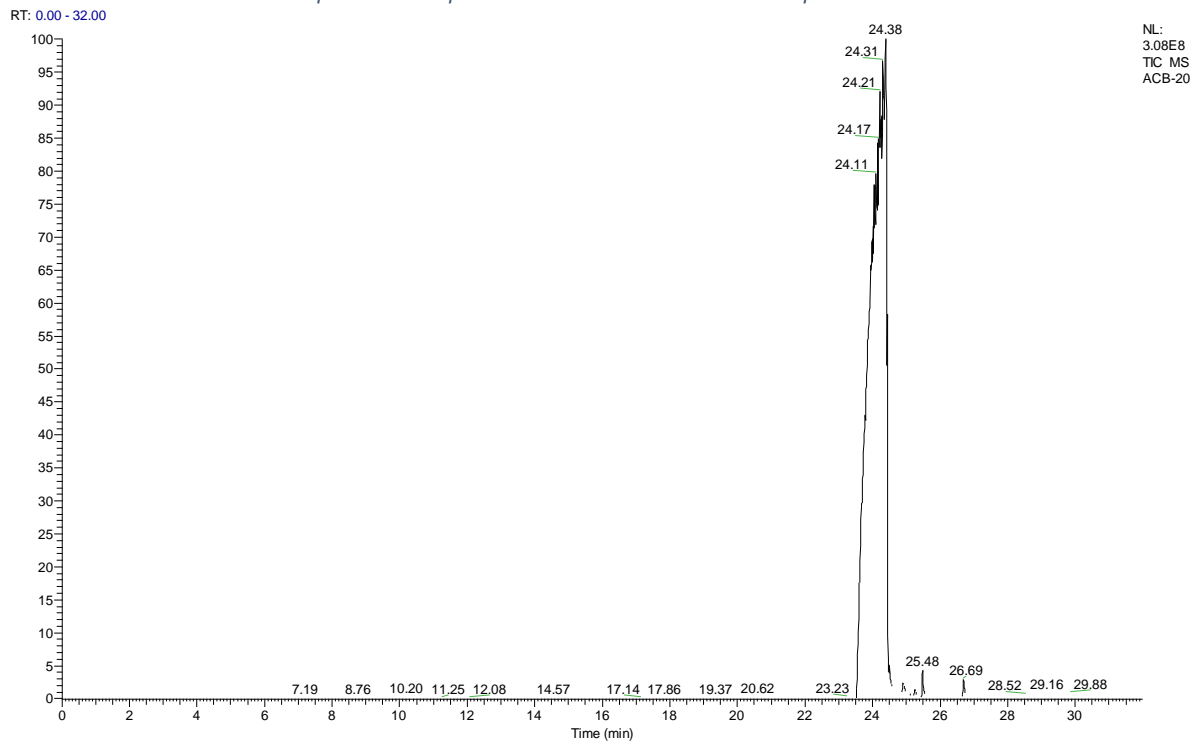
Espectro 141. Espectro RMN ¹H zona aromática compuesto 18



Espectro 142. Espectro RMN ¹³C compuesto 18

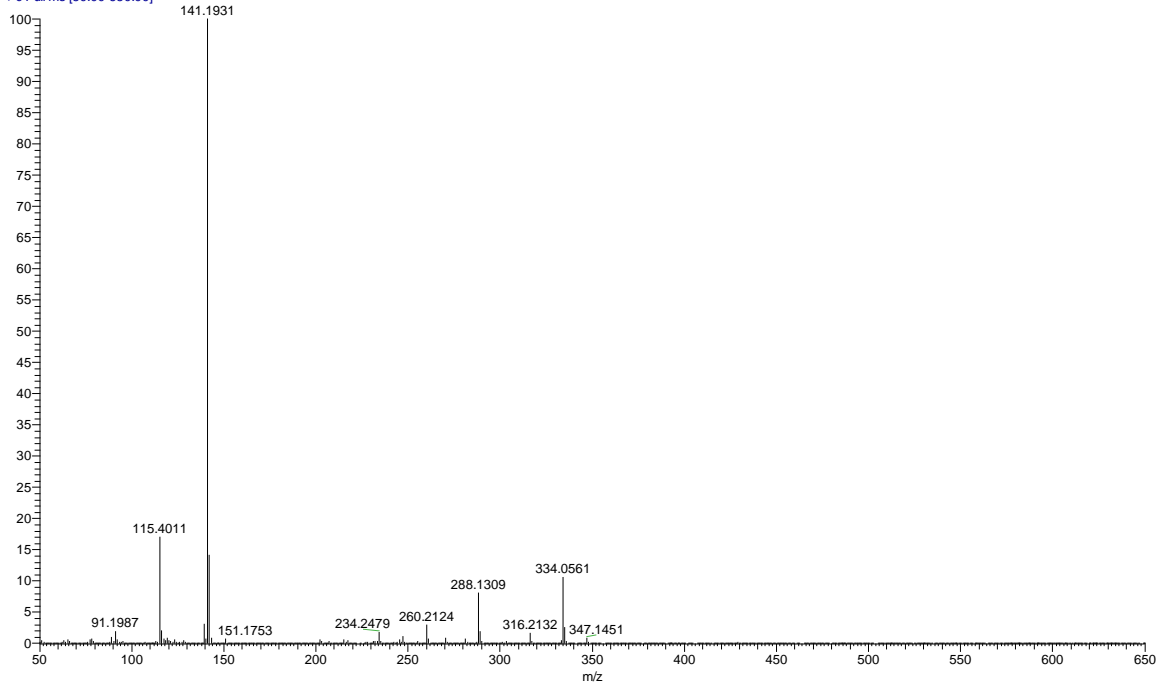


Espectro 143. Espectro RMN ¹³C zona aromática compuesto 18

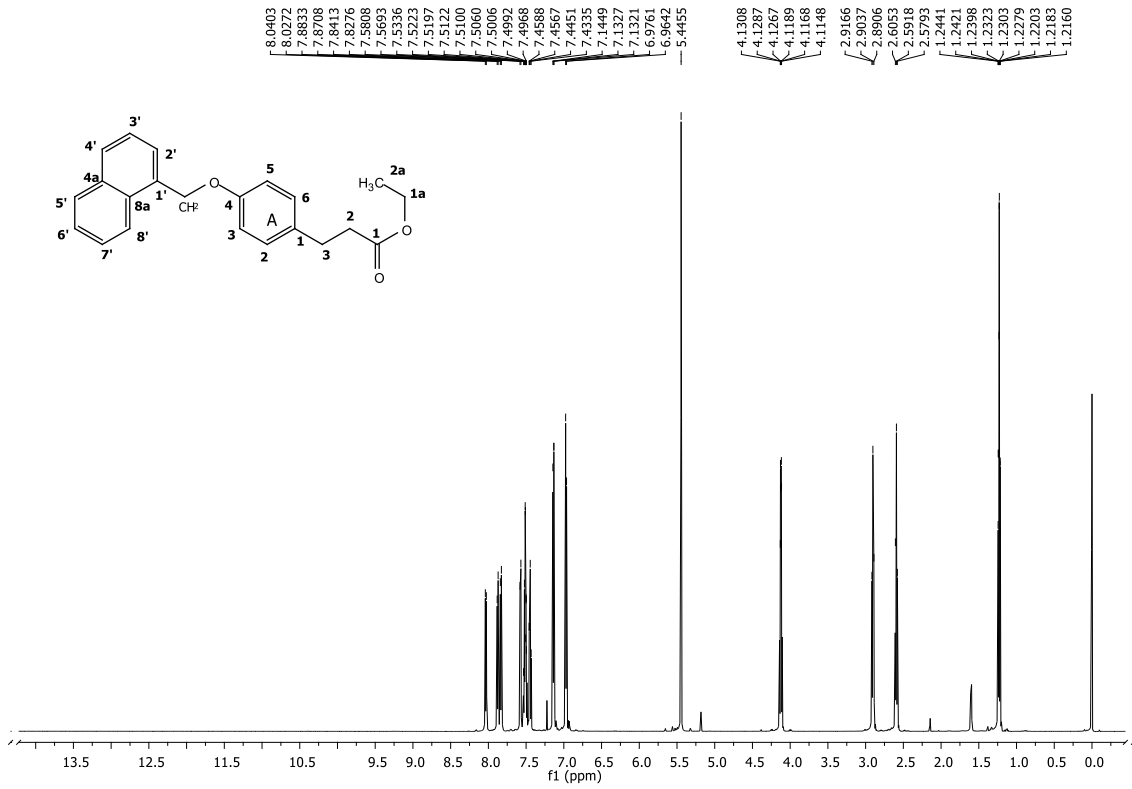


Espectro 144. Cromatograma del compuesto 19

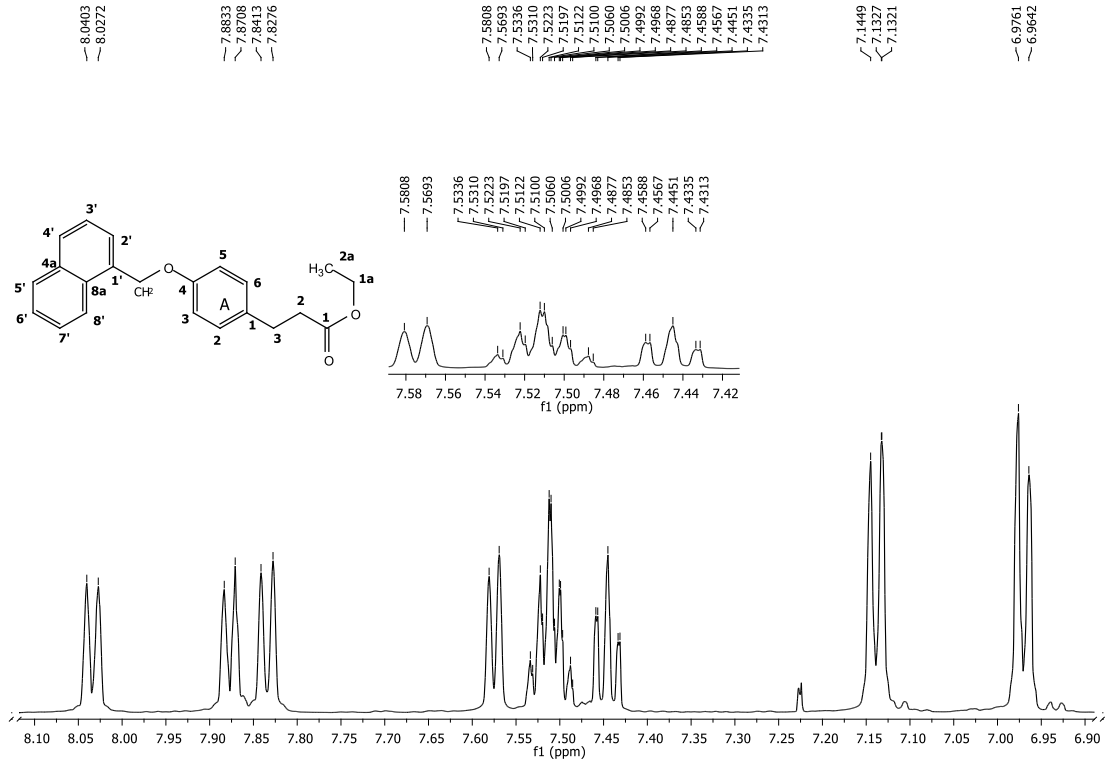
ACB-20 #1696-1764 RT: 23.68-24.32 AV: 69 SB: 1065 24.74-30.82, 19.08-23.46 NL: 9.82E7
T: + c Full ms [50.00-650.00]



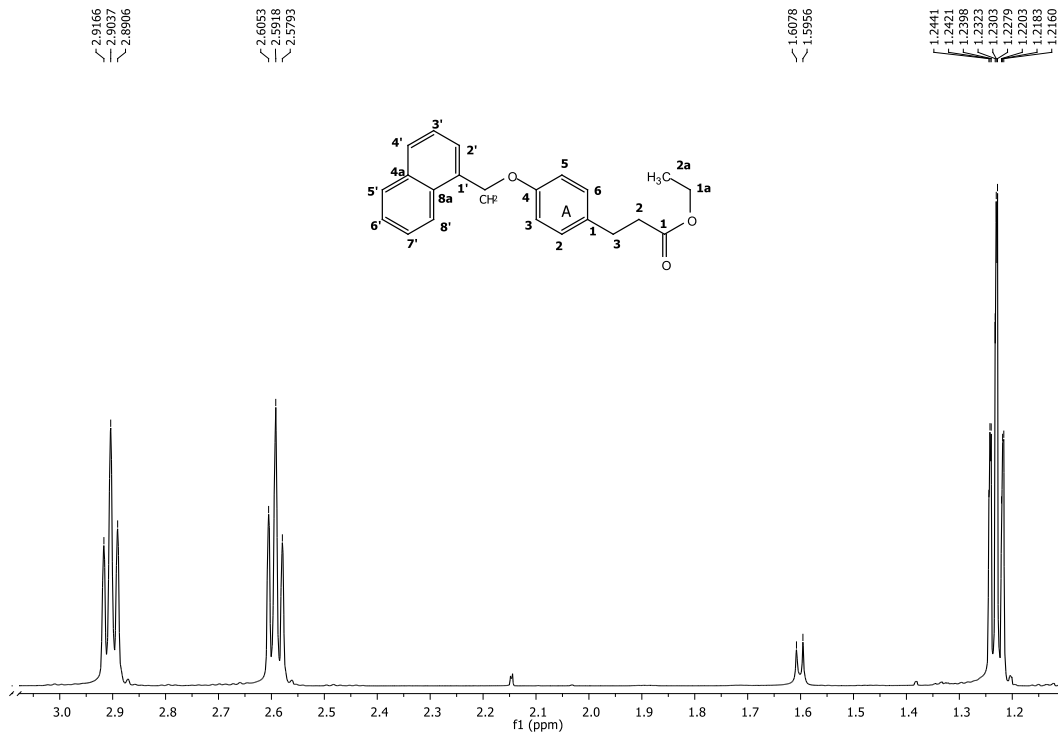
Espectro 145. Patrón de fragmentación del compuesto 19 modalidad IE



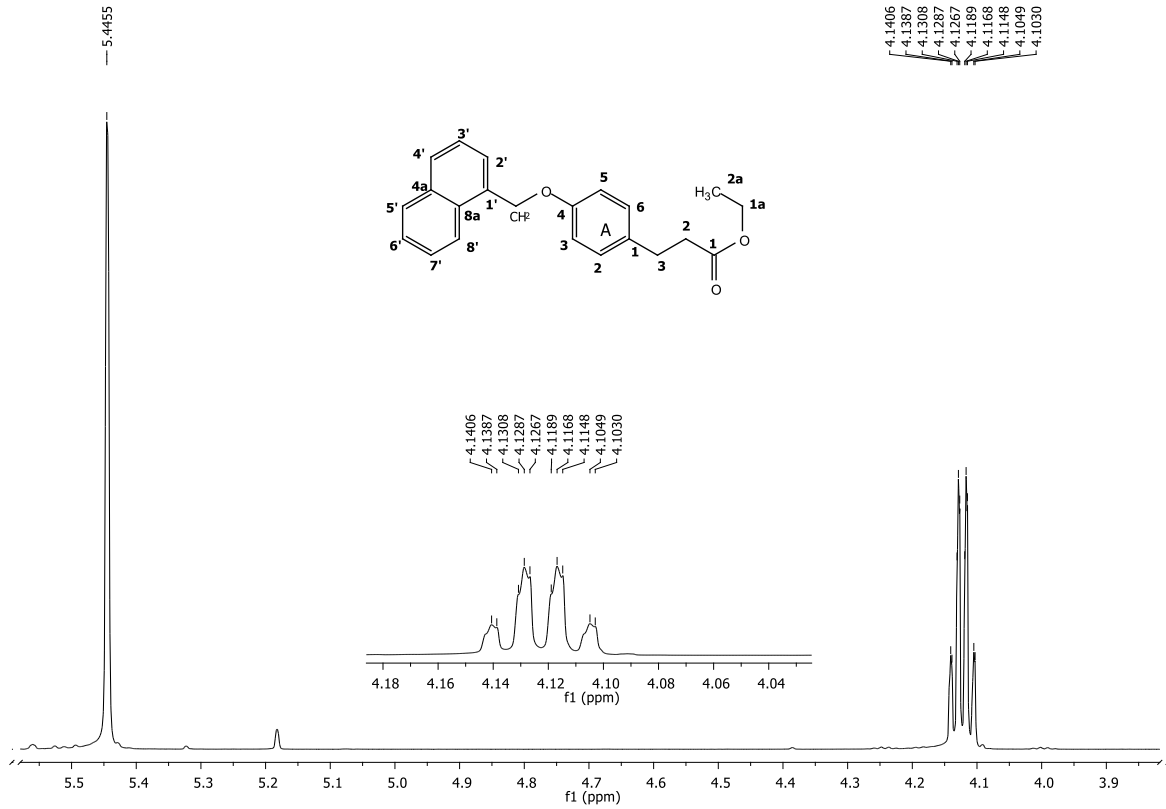
Espectro 146. Espectro RMN ¹H compuesto 19



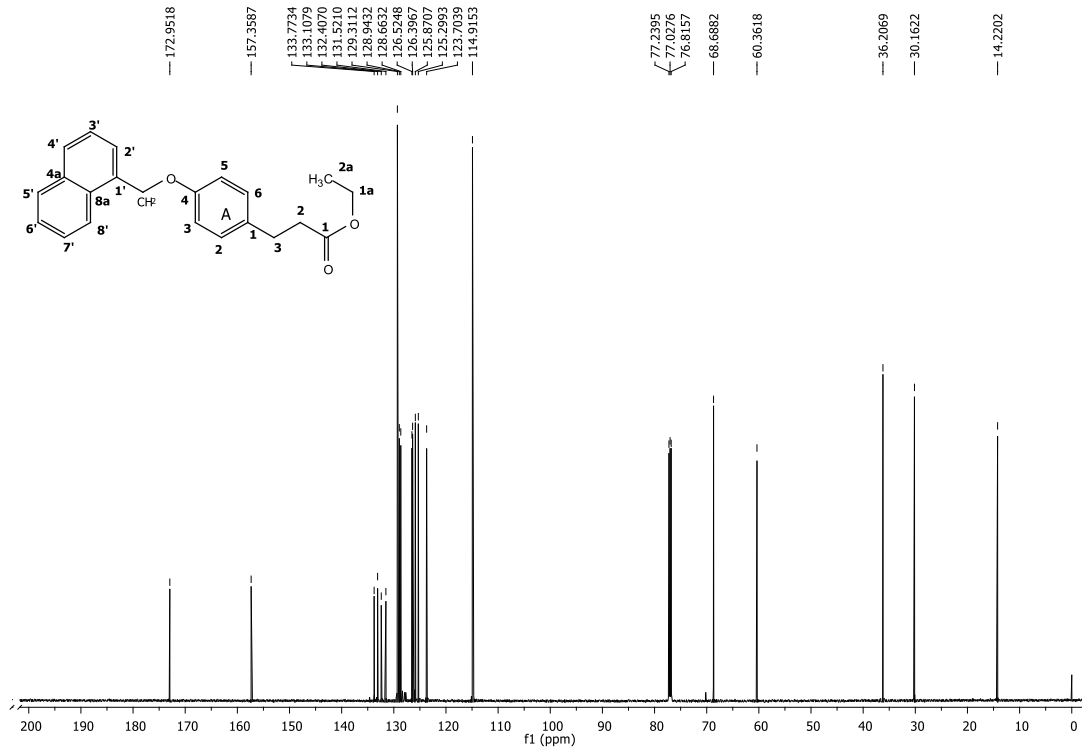
Espectro 147. Espectro RMN ¹H zona aromática compuesto 19



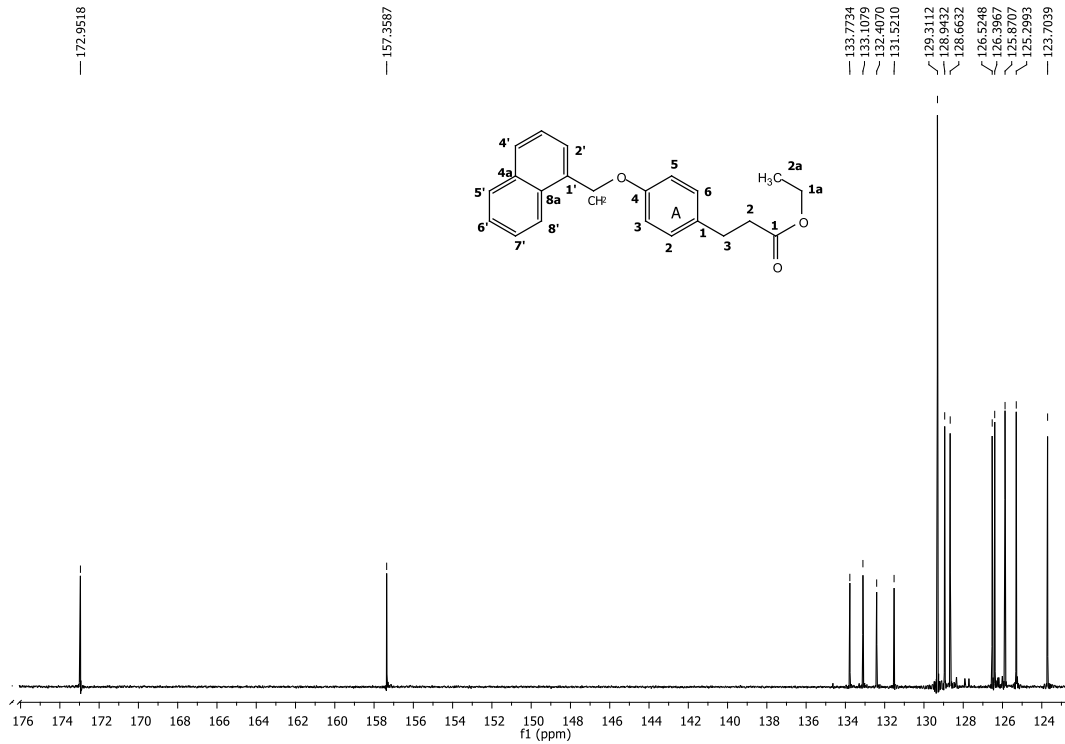
Espectro 148. Espectro RMN ¹H zona alifática compuesto 19



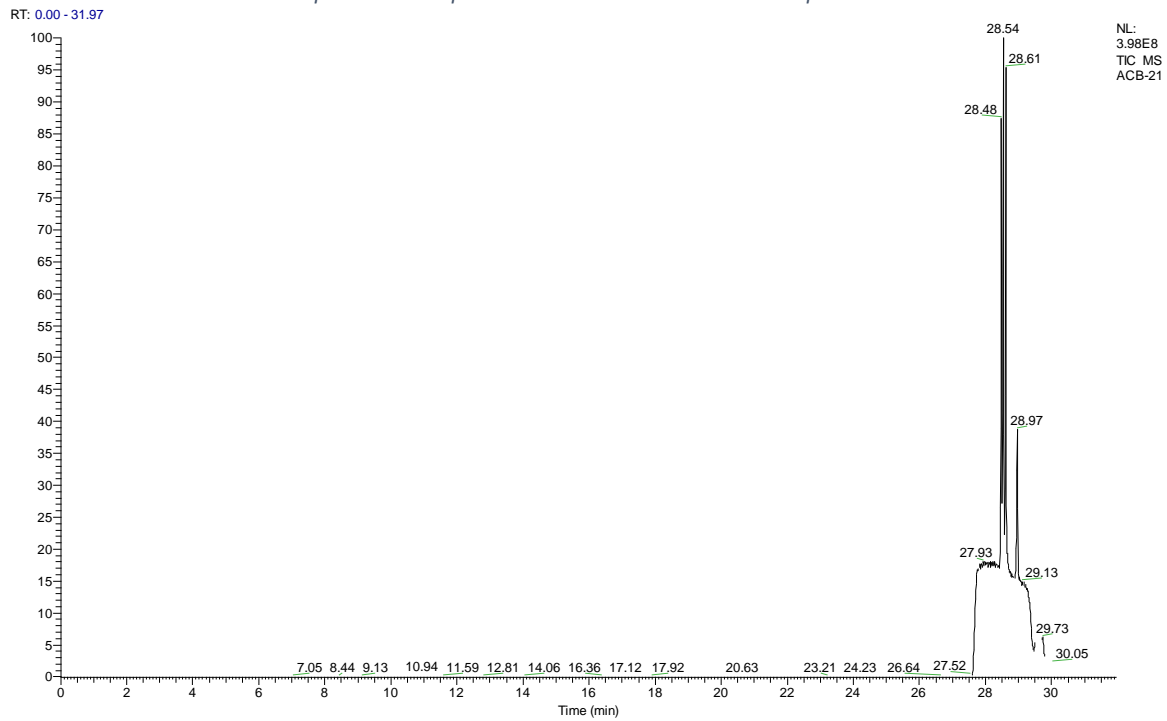
Espectro 149. Espectro RMN ¹H zona alifática compuesto 19



Espectro 150. Espectro RMN ¹³C compuesto 19

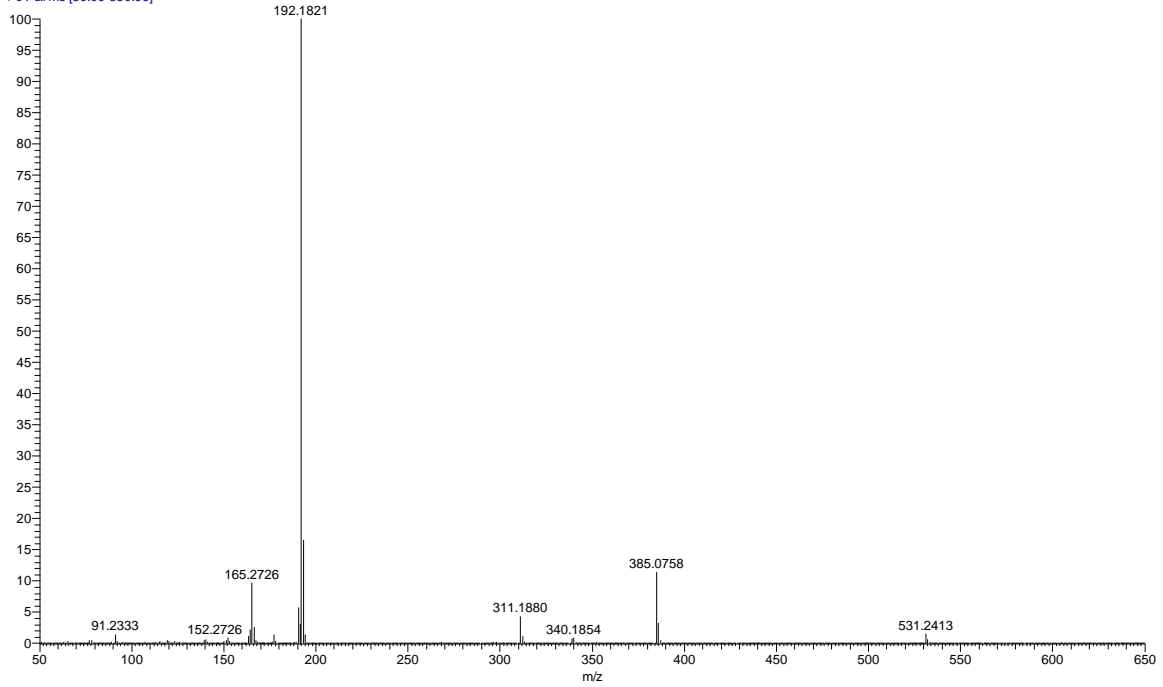


Espectro 151. Espectro RMN ¹³C zona aromática compuesto 19

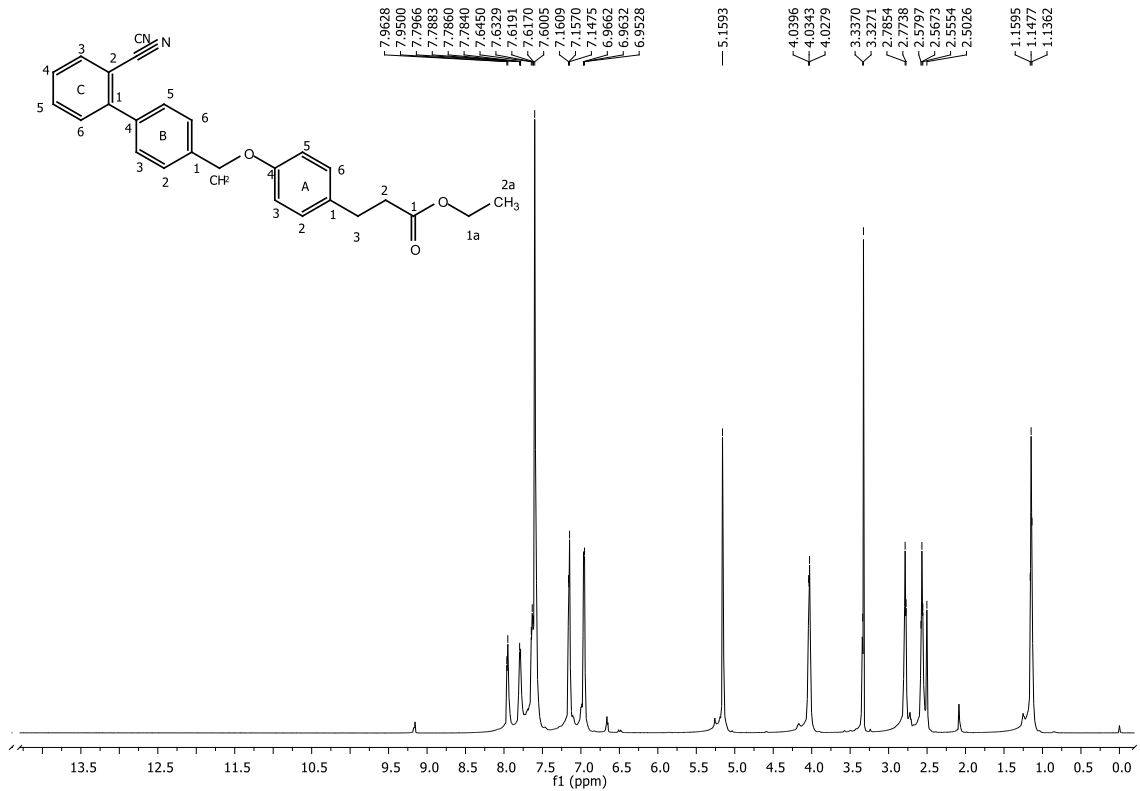


Espectro 152. Cromatograma compuesto 20

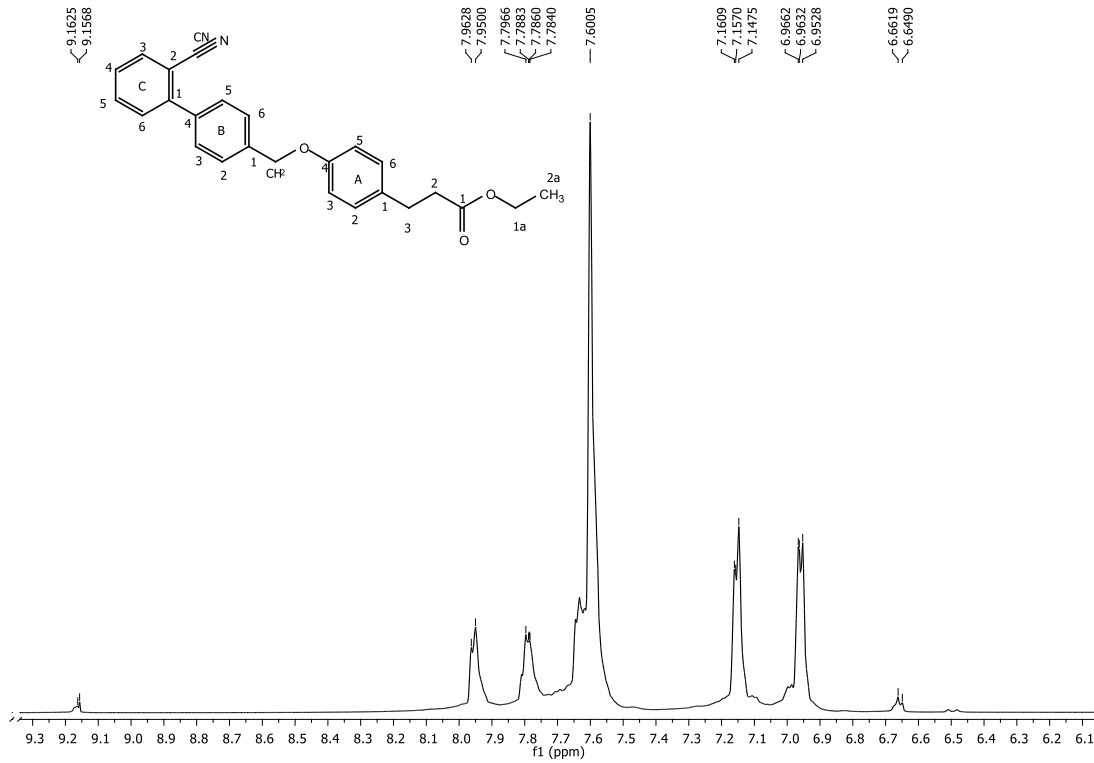
ACB-21 #2107-2292 RT: 27.66-29.35 AV: 186 SB: 243 29.43-30.69, 26.65-27.63 NL: 3.90E7
 T: + c Full ms [50.00-650.00]



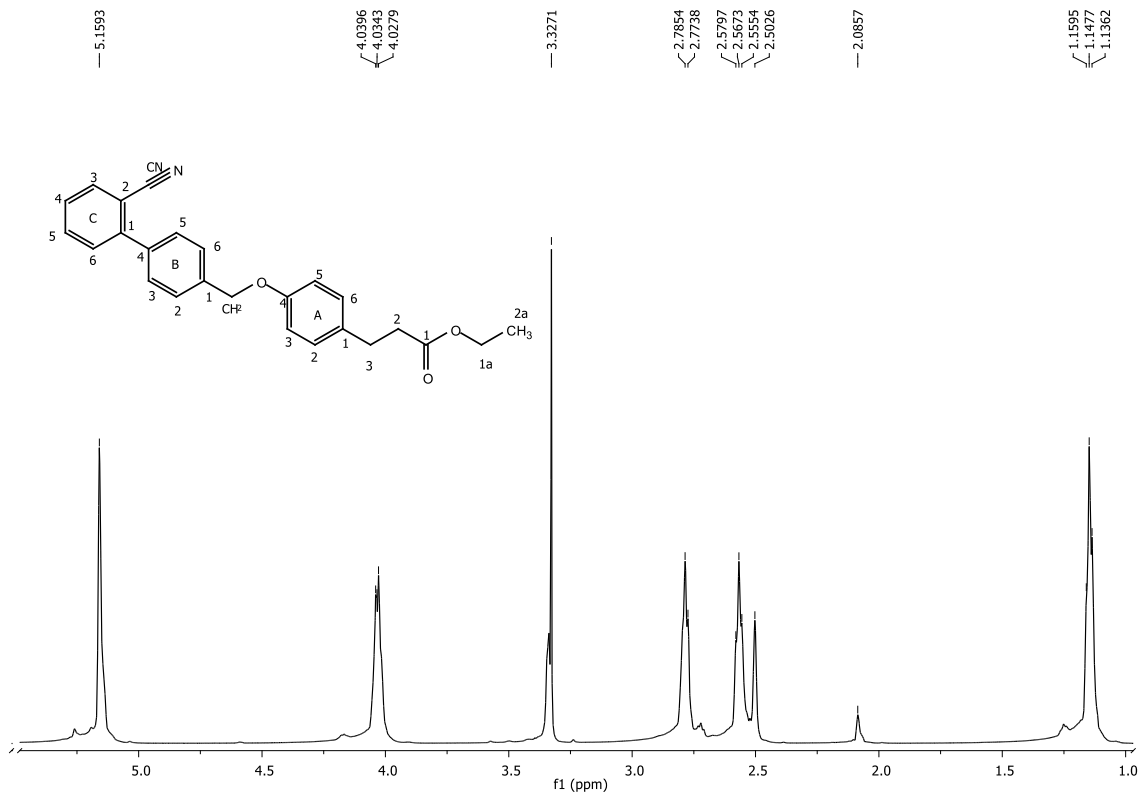
Espectro 153. Patrón de fragmentación del compuesto 20 modalidad IE



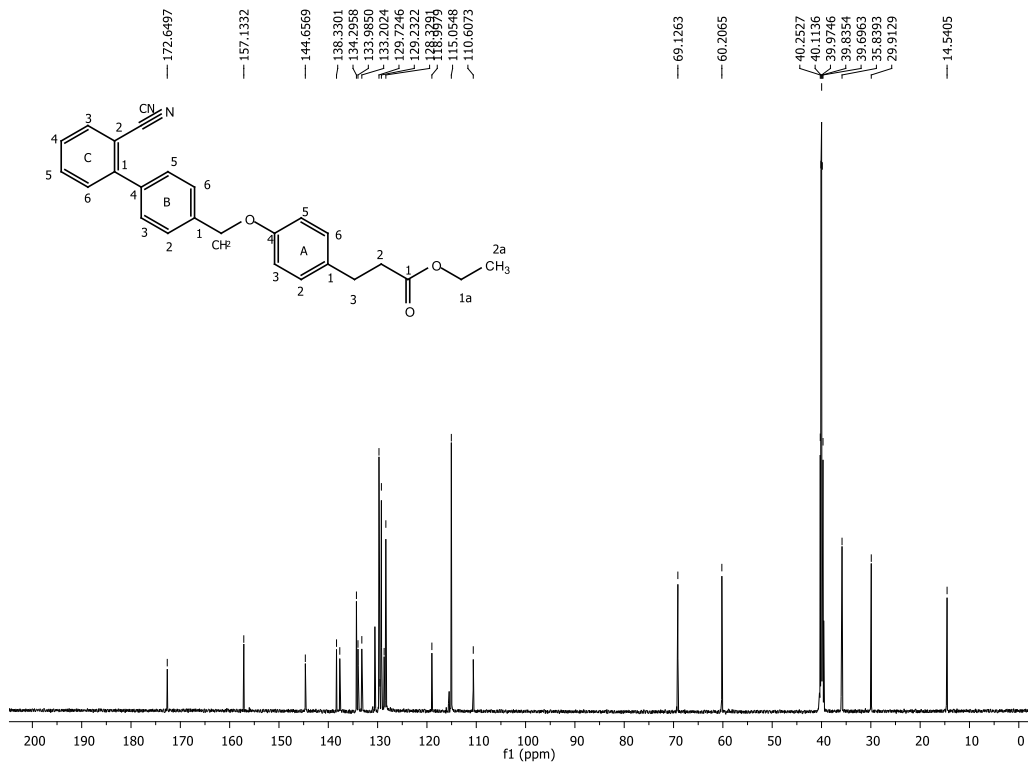
Espectro 154. RMN ¹H compuesto 20



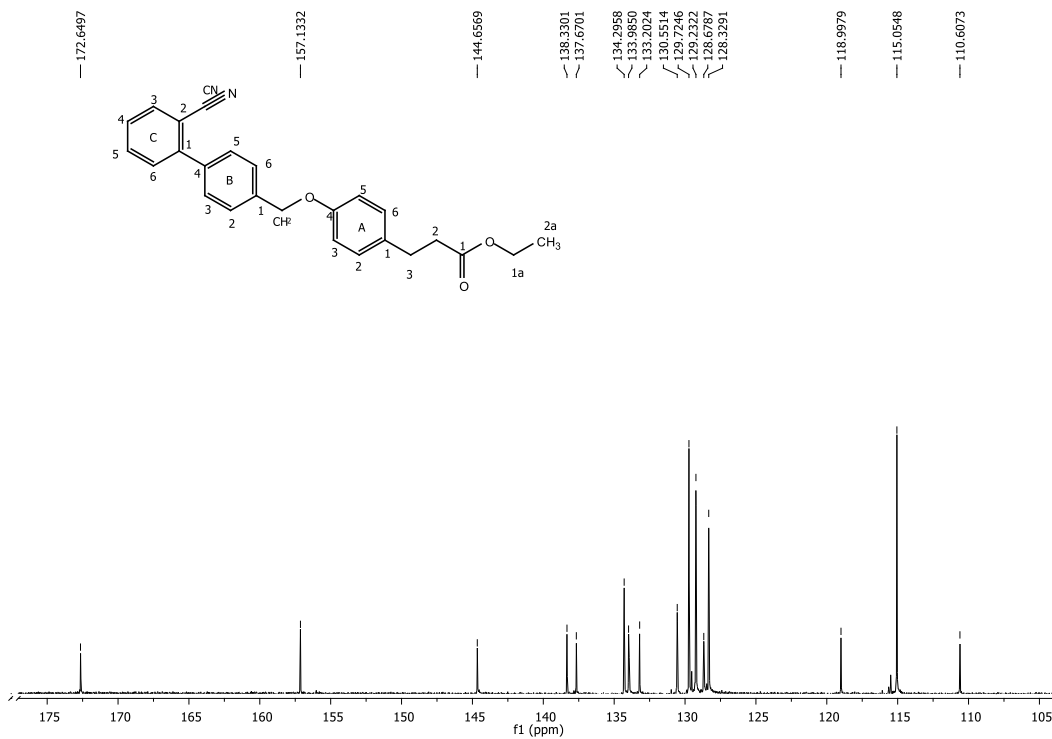
Espectro 155. RMN ¹H zona aromática compuesto 20



Espectro 156. RMN ¹H zona alifática compuesto 20



Espectro 157. RMN ¹³C compuesto 20



Espectro 158. RMN ¹³C zona aromática compuesto 20



Article

Design, Synthesis and in Combo Antidiabetic Bioevaluation of Multitarget Phenylpropanoic Acids †

Blanca Colín-Lozano ¹, Samuel Estrada-Soto ¹ , Fabiola Chávez-Silva ¹, Abraham Gutiérrez-Hernández ¹, Litzia Cerón-Romero ¹ , Abraham Giacomani-Martínez ², Julio Cesar Almanza-Pérez ² , Emanuel Hernández-Núñez ³, Zhilong Wang ⁴, Xin Xie ⁴, Mario Cappiello ⁵ , Francesco Balestri ⁵, Umberto Mura ⁵ and Gabriel Navarrete-Vazquez ^{1,*}

¹ Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico; clbi_ff@uaem.mx (B.C.-L.); enoch@uaem.mx (S.E.-S.); facasy@gmail.com (F.C.-S.); ghaa_ff@uaem.mx (A.G.-H.); crlc_ff@uaem.mx (L.C.-R.)

² Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Ciudad de México 09340, Mexico; agmfest@hotmail.com (A.G.-M.); j.almanza.perez@gmail.com (J.C.A.-P.)

³ Cátedra CONACyT, Departamento de Recursos del Mar, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Mérida, Yucatán 97310, Mexico; emanuel.hernandez@cinvestav.mx

⁴ CAS Key Laboratory of Receptor Research, the National Center for Drug Screening, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; endlesslily@hotmail.com (Z.W.); xxie@simm.ac.cn (X.X.)

⁵ Dipartimento di Biologia, Unità di Biochimica, University of Pisa, 56126 Pisa, Italy; mcappiello@biologia.unipi.it (M.C.); francesco.balestri@unipi.it (F.B.); umberto.mura@unipi.it (U.M.)

* Correspondence: gabriel_navarrete@uaem.mx; Tel.: +52-777-329-7089

† Taking in part of the Ph.D. Thesis of Blanca Colín-Lozano.

Received: 8 January 2018; Accepted: 3 February 2018; Published: 6 February 2018

Abstract: We have synthesized a small series of five 3-[4-arylmethoxy)phenyl]propanoic acids employing an easy and short synthetic pathway. The compounds were tested *in vitro* against a set of four protein targets identified as key elements in diabetes: G protein-coupled receptor 40 (GPR40), aldose reductase (AKR1B1), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 (GLUT-4). Compound 1 displayed an EC₅₀ value of 0.075 μ M against GPR40 and was an AKR1B1 inhibitor, showing IC₅₀ = 7.4 μ M. Compounds 2 and 3 act as slightly AKR1B1 inhibitors, potent GPR40 agonists and showed an increase of 2 to 4-times in the mRNA expression of PPAR γ , as well as the GLUT-4 levels. Docking studies were conducted in order to explain the polypharmacological mode of action and the interaction binding mode of the most active molecules on these targets, showing several coincidences with co-crystal ligands. Compounds 1–3 were tested *in vivo* at an explorative 100 mg/kg dose, being 2 and 3 orally active, reducing glucose levels in a non-insulin-dependent diabetes mice model. Compounds 2 and 3 displayed robust *in vitro* potency and *in vivo* efficacy, and could be considered as promising multitarget antidiabetic candidates. This is the first report of a single molecule with these four polypharmacological target action.

Keywords: diabetes; GPR40; AKR1B1; PPAR γ ; GLUT-4